



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

CINÉTICA LEUCOCITÁRIA NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DA PARVOVIROSE CANINA

VERA SANTOS PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI
PRESIDENTE:

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

VOGAIS:

Doutora Maria Manuela Grave Rodeia Espada Niza

Doutora Maria Isabel Ferreira Neto da Cunha Fonseca

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADORA:

Doutora Maria Manuela
Grave

Rodeia Espada Niza

CO-ORIENTADORA:

Doutora Maria Isabel
Ferreira

Neto da Cunha Fonseca

2011

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer à Professora Doutora Maria Manuela Grave Rodeia Espada Niza a inspiração e transmissão de sapiência. Obrigado pelo apoio e pela constante motivação de procura de rigor e conhecimento.

Agradeço à Professora Doutora Isabel Neto toda a ajuda no tratamento estatístico dos dados e a disponibilidade e prontidão sempre demonstrada.

Agradeço ao corpo clínico da *Azevet*. Um muito obrigada à Dra. Ivana Coimbra pelos seus muitos ensinamentos práticos, pela transmissão de técnicas ancestrais secretas de cateterização e, acima de tudo, pela enorme amizade e sorriso cúmplice me ofereceu desde o primeiro minuto. Agradeço à Dra. Helena Guerreiro as passagens pelo mundo da clínica de animais exóticos e a sua companhia única em momentos de bom humor e loucura partilhada. Agradeço também ao Dr. Rui Lemos Ferreira o seu interesse por ensinar e motivar a busca de conhecimento, em especial o de índole ecográfica.

Agradeço às auxiliares de veterinária da *Azevet*. Obrigada à Paula Pereira por todo o companheirismo e boa disposição. Agradeço à Rita Ferrete a sua simpatia e amizade e à Sílvia Luís pelo seu sorriso genuíno e motivação positiva. Obrigada a todas por me mostrarem os truques da “casa” e por toda a ajuda ao longo do estágio.

Agradeço ao Laboratório de Análises Clínicas Prof. Doutor Braço Forte a realização de todos os hemogramas, os quais foram imprescindíveis à realização deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Gonçalo Vicente a sua paciência e constante boa disposição ao longo da realização do curso. Muito obrigada pelas recepções de braços sempre abertos que se tornaram numa grande amizade.

Agradeço aos meus pais por me terem permitido realizar o meu sonho de infância e pela constante motivação e apoio. Sem eles não me teria tornado a pessoa que sou. Agradeço também ao meu irmão Ricardo, que sempre acreditou em mim e me vez andar em frente em muitas horas mais difíceis.

Agradeço aos meus amigos, tanto aos que conheci na Universidade de Évora como os que conheci na Faculdade de Medicina Veterinária, mas também aos que são anteriores a tudo isso. Obrigada em particular à Tânia Tomé, à Marta Horta, ao David Santos e à Inês Salvado pelas horas e horas de diversão e riso. Agradeço também à minha “velha” amiga Andreia Santos toda a paciência que me ofereceu nestes anos de caminhada.

Agradeço por último mas acima de todos, ao Tiago Soares por ter estado sempre a meu lado durante todo o curso e por acreditar sempre em mim, mesmo nas alturas mais negras em que a minha crença fraqueja. Obrigada pela partilha da tua visão.

CINÉTICA LEUCOCITÁRIA NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DA PARVOVIROSE CANINA

RESUMO

Este trabalho teve por objectivo a caracterização da frequência da mortalidade, raça, idade e sexo, bem como a sazonalidade da parvovirose canina. Foram também estudados o estado vacinal e a apresentação clínica dos animais infectados. Procedeu-se ainda ao estudo do comportamento das linhas leucocitárias durante o período de internamento.

Num estudo observacional composto por 14 casos retrospectivos e 14 prospectivos de canídeos com diagnóstico clínico de parvovirose canina confirmado através de teste ELISA, obtiveram-se hemogramas completos diariamente enquanto o animal permanecesse em internamento. Os dados extraídos dos hemograma constituíram grupos correspondentes ao número de dias de internamento.

Os resultados revelaram uma mortalidade de 14,3% (n=4/28). 42,9% dos animais em estudo pertenciam ao sexo feminino (n=12/28) e 57,1% ao sexo masculino (n=16/28). A maior frequência de casos ocorreu na faixa etária dos 2 aos 6 meses de idade (67,9%, n=19/28), nos meses de Setembro a Novembro (67,9%, n=19/28), e em animais de raça indeterminada (67,9%, n=19/28). Os animais distribuíram-se por 8 raças diferentes, sendo a mais representativa a Epagneul Bretão 7,1% (n=2/28).

Relativamente à evolução dos leucócitos, os resultados evidenciaram a ocorrência de leucopénia entre os dias 2 e 4, linfopénia aos dias 1 e 3 e eosinopénia aos dias 2, 4 e 5. Estes resultados permitem concluir que os animais com infecção com parvovírus se encontram com quadros mais graves entre os dias 1 a 5 do decurso da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Parvovírus, Canino, Cinética leucocitária, Internamento.

LEUKOCITARY KINETICS IN THE CLINICAL EVOLUCION OF THE CANINE PARVOVIROSIS

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the frequency of mortality, breed, age and gender, as well as the seasonality in canine parvovirus enteritis. The vacinal status and the clinical presentation of the infected animals were also subject of study. In addition, the behavior of the leukocyte lines during hospitalization was analyzed.

In an observational study composed of 14 retrospective and 14 prospective cases of dogs with clinical diagnosis of canine parvoviral enteritis confirmed with ELISA, complete blood counts (CBC) were obtained daily whilst the animal was hospitalized. The data extracted from the CBCs constituted groups that corresponded to the number of days of hospitalization.

The results showed a mortality of 14,3% (n=4/28). 42,9% of the studied animals were females (n=12/28) and 57,1% males. The higher frequency of cases occurred from 2 to 6 months of age (67,9%, n=19/28), between the months of September and November (67,9%, n=19/28) and in animals of undetermined breed (67,9%, n=19/28). The animals were distributed in 8 different breeds, the most representative being the Epagneul Breton 7,1% (n=2/28).

In regard to the leukocyte evolution, the results showed the presence of leukopenia between the days 2 and 4, lymphopenia during the days 1 and 3 and eosinopenia on days 2, 4 and 5. These results allow the conclusion that animals with parvoviral infection have a more severe clinical status between the days 1 through 5 of the disease.

KEY-WORDS: Parvovirus, Canine, Leukocytary Kinetics, Hospitalization.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Etiologia.....	5
1.2 Gastroenterite causada por Parvovírus	7
1.2.1 Epidemiologia.....	7
1.2.2 Patogênese.....	10
1.2.3 Sintomatologia.....	13
1.2.4 Parâmetros laboratoriais.....	18
1.2.5 Necrópsia.....	20
1.2.6 Diagnóstico.....	23
1.2.7 Abordagem terapêutica.....	30
1.2.8 Prevenção e Medidas Profiláticas.....	38
1.3 Cinética leucocitária.....	42
2 OBJECTIVOS.....	54
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1 Desenho de estudo.....	55
3.2 Métodos complementares de diagnóstico.....	55
3.3 Variáveis estudadas.....	57
3.4 Métodos Estatísticos.....	58
4 RESULTADOS.....	59
4.1 Caracterização da amostra em estudo.....	59
4.2 Caracterização do estímulo iatrotópico e principais queixas dos proprietários dos animais em estudo.....	65
4.3 Resultados do leucograma.....	67
4.4 Evolução da contagem total média de leucócitos durante o período de hospitalização.....	69
4.5 Evolução da contagem absoluta média de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, associadas à extensão do período de internamento.....	71
5 DISCUSSÃO.....	75
6 CONCLUSÕES.....	86
7 BIBLIOGRAFIA.....	87
ANEXOS.....	102
ANEXO I – Resultados de índices eritrocitários e plaquetas.....	103
ANEXO II - Resultados de neutrófilos não segmentados e basófilos.....	105
ANEXO III – Casuística Médica e Cirúrgica em Animais de Companhia.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – a) - Canídeo de raça indeterminada, 14 meses de idade, com parvovirose. Aspecto de diarreia hemorrágica. b) – Canídeo de raça Epagneul Bretão, 20 meses de idade, com parvovirose. Aspecto de diarreia hemorrágica.....	13
Figura 2 – Dejecção diarreica de canídeo com parvovirose. De notar a presença de coágulos sanguíneos.....	14
Figura 3 – Canídeo de raça Epagneul Bretão, 20 meses de idade, com parvovirose, em hipotermia por septicémia.....	15
Figura 4 – Placa de teste rápido Witness Parvo [®] , em caso de positividade. Notar as numerações da cúpula (1) e da janela de leitura (2 e 3).....	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos casos em estudo face ao resultado de internamento por sexo.....	59
Tabela 2 – Distribuição da idade em meses dos casos em estudo.....	59
Tabela 3 – Distribuição das raças por sexo dos animais em estudo.....	61
Tabela 4 – Distribuição do desfecho em relação ao número de vacinas dos animais em estudo.....	61
Tabela 5 – Distribuição do desfecho face ao estado vacinal dos casos em estudo.....	62
Tabela 6 - Número de casos e frequência de sinais clínicos mencionados na consulta.....	64
Tabela 7 – Resultados para o leucograma, incluindo os valores mínimo e máximo, média e desvio padrão diários.....	66

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição da idade em meses por sexo.....	60
Gráfico 2 – Distribuição da ocorrência de casos pelos dos meses do ano.....	62
Gráfico 3 – Distribuição da duração de hospitalização em percentagem.....	63
Gráfico 4 – Distribuição de sinais clínicos mencionados na consulta.....	64
Gráfico 5 – Número de casos para cada apresentação clínica dos animais em estudo...	65
Gráfico 6 – Evolução da média da contagem de leucócitos durante o internamento, em valor absoluto. I.C. 95%.....	68
Gráfico 7 – Evolução da média da contagem de neutrófilos segmentados durante o internamento, em valor absoluto.....	70
Gráfico 8 – Evolução da média da contagem de linfócitos durante o internamento, em valor absoluto.....	71
Gráfico 9 – Evolução da média da contagem de monócitos durante o internamento, em valor absoluto.....	72
Gráfico 10 – Evolução da média da contagem de eosinófilos durante o internamento, em valor absoluto	73

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac – Anticorpos
ADN – Ácido desoxirribonucleico
ARDS- Síndrome Respiratório Agudo Grave
ARN – Ácido ribonucleico
ARNm – Ácido ribonucleico mensageiro
Bas - Basófilos
C – Celsius
cG-CSF – Factor estimulante de colónias granulocíticas canino
CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CID – Coagulação Intravascular Disseminada
CTZ - Chemoreceptor Trigger Zone
CVEF - Coronavírus entérico felino
dl – Decilitro
EDTA – Ethylenediamine tetra-acetic acid
ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*
Eos – Eosinófilos
EV – Endovenoso
fl – Fentolitro
g – Grama
GEH - Gastroenterite hemorrágica
GI - Gastrointestinal
Glu - Glucose
G- CSF - Factor estimulante de colónias granulocíticas
h – hora
HA – Hemaglutinação
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média
HDL – *High- density lipoprotein*
Hg – Hemoglobina
Ht – Hematócrito
IC - Imunocromatografia
I.C. – Intervalo de confiança
ICC - Insuficiência cardíaca congestiva
ID – Intestino delgado
IgE - Imunoglobulina E
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IH - Inibição da Hemaglutinação
IF - Imunofluorescência
IMR – Imunomigração rápida
ITU - Infecção do tracto urinário
IV - Isolamento Viral
Kg – Quilograma
LN – Linfonodos
LPS - Lipopolissacarídeos
Macs – Anticorpos Monoclonais
M:E - Ratio mielóide:eritróide
mEq - Miliequivalentes
mg – Miligrama
ml - Mililitro
mm – Milímetro

Mon – Monócitos
 n° - Número
 NPO - Nada *per os*
 nt - Nucleótidos
 NV - Neutralização Viral
 NNS – Neutrófilos não segmentados
 NS – Neutrófilos segmentados
 PCR – *Polymerase chain reaction*
 pg – Picograma
 PI – Período de incubação
 PFU – *Plaque-forming unit*
 PNC - Pool de neutrófilos circulante
 PNM - Pool de neutrófilos marginal
 PVC – Parvovírus Canino
 rcG-CSF – Factor estimulante de colónias granulocíticas recombinante canino
 rhG-CSF – Factor estimulante de colónias granulocíticas recombinante humano
 RT-PCR – *Real time Polymerase chain reaction*
 SMF – Sistema mononuclear fagocítico
 SNC - Sistema nervoso central
 SRIS – Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica
 TNF α - Factor de necrose tumoral α
 TRC – Tempo de repleção capilar
 VCM – Volume Corpuscular Médio
 VGET - Vírus da gastroenterite transmissível
 VPIF - Vírus da peritonite infecciosa felina (VPIF)
 α - Alfa
 ° - Graus
 μ g – Micrograma
 μ L – Microlitro
 μ m - Micrometro
 - - Negativo
 % - Percentagem
 + - Positivo

NOTA PRÉVIA

A presente dissertação foi realizada no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. O estágio decorreu no período compreendido entre 1 de Agosto de 2009 e 31 de Janeiro de 2010, na AZEVET – Clínica Veterinária, sita em Brejos de Azeitão, Setúbal, sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Manuela Grave Rodeia Espada Niza que ali desempenha funções de Directora Clínica. Adicionalmente ao acompanhamento das actividades clínicas, realizou-se a pesquisa e tratamento de dados para o tema que constitui esta dissertação.

As actividades clínicas desenvolvidas durante o estágio consistiram no acompanhamento e participação activa em consultas, tratamentos, internamentos e procedimentos pré, intra e pós-cirúrgicos, bem como dos métodos complementares de diagnóstico. De entre estes, destacam-se a radiologia, a electrocardiografia e a ecografia. Algumas das actividades médicas e cirúrgicas acompanhadas são ilustradas no Anexo III.

A presente dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária tem como objectivo estudar a evolução dos diferentes tipos de leucócitos durante o período de internamento em animais com diagnóstico de gastroenterite por PVC-2 (Parvovírus Canino). Realizou-se o estudo de 28 casos em canídeos entre 2006 e 2010, procedendo-se à análise estatística dos dados e à sua discussão, a partir da qual foram retiradas conclusões, como se apresentam em seguida.

1 INTRODUÇÃO

A partir da década de 70 as enterites virais tornaram-se reconhecidas como a principal causa de diarreia infecciosa em cães com idade inferior a 6 meses. A enterite por parvovírus canina é possivelmente a doença infecciosa mais comum dos cães (McCaw & Hoskins, 2006; Sellon, 2005; Mims, Nash & Stephen, 2001).

Existem dois serótipos de parvovírus capazes de infectar canídeos, o parvovírus canino tipo 1 (PVC-1) e o tipo 2 (PVC-2). Até 1985, o PVC-1 era tido como não patogénico, mas a partir de então passou a ser associado a síndromes neonatais de enterite, bronquite e pneumonia intersticial, miocardite e linfadenite em cachorros entre os 5 e 21 dias de idade. O PVC-2 está associado a quadros de gastroenterite hemorrágica (Sellon, 2005; McCaw & Hoskins, 2006; Berns & Parrish, 2007; Harrison, Styer, Pursell, Carmichael & Nietfeld, 1992; Tennant, 2001; Hall & German, 2005; Mims *et al.*, 2001).

O parvovírus canino (PVC) foi descrito pela primeira vez em 1978 por Appel, Cooper, Greisen e Carmichael como agente patogénico associado a vômito, anorexia, diarreia e desidratação rápida, particularmente em cachorros. Actualmente são conhecidos dois serótipos de PVC e três estirpes de PVC-2.

A estirpe original PVC-2 sofreu alterações genéticas que resultaram no aparecimento de novas variantes. Entre 1979 e 1981 foi substituída por uma nova estirpe, a qual foi identificada recorrendo à utilização de anticorpos monoclonais e foi designada PVC-2a. Durante a década de 80, após várias mutações genéticas, surgiu outra variante a PVC-2b (Parrish, O'Connell, Evermann & Carmichael, 1985; Parrish *et al.*, 1991).

Estas mutações do PVC-2 constituem alterações biológicas e antigénicas importantes, pois traduzem mudanças no leque de hospedeiros (Tryuen & Parrish, 1992; Tryuen, Evermann, Vieler & Parrish, 1996; Parker, Murphy, Wang, O'Brien & Parrish, 2001; Hueffer *et al.*, 2003).

As duas variantes antigénicas, PVC-2a e PVC-2b, substituíram o tipo 2 original, e actualmente estão disseminadas à escala global e distribuídas de forma variada nas populações caninas de todo o mundo (Mochizuki, Harasawa & Nakatani, 1993a; Ybanez, Vela, Cortes, Simarro & Casal, 1995; Greenwood, Chalmers, Baxendale & Thompson, 1996; Truyen, Platzer & Parrish, 1996; Truyen, Steinell, Bruckner, Lutz &

Mostl, 2000; Steinel, Venter, Van Vuuren, Parrish & Truyen, 1998; Sagazio, Tempesta, Buonavoglia, Cirone & Buonavoglia, 1998; Buonavoglia, *et al.*, 2000; Pereira, Monezi, Mehnert, D'Angelo & Durigon, 2000).

Uma terceira estirpe de PVC-2, inicialmente designada mutação Glu-426 e posteriormente designada PVC-2c, foi detectada em Itália no ano 2000 e actualmente circula nesse país conjuntamente com as estirpes 2a e 2b. A nova variante também foi reportada no Vietname, em Espanha, nos Estados Unidos da América, na América do Sul, em Portugal e, mais recentemente, em França (Buonavoglia *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2004; Decaro *et al.*, 2006d; Hong *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2007a; Decaro *et al.*, 2009c).

Apesar das descrições iniciais indicarem que esta nova estirpe possuía baixa patogenicidade, veio a constatar-se experimental e clinicamente que origina quadros clínicos mais graves, taxas de mortalidade mais elevadas e tem ainda a capacidade de infectar animais adultos, mesmo que repetidamente vacinados (Decaro *et al.*, 2009b).

Em Portugal, esta nova variante foi detectada primeiramente num estudo datado de 2007, evidenciando uma distribuição semelhante à da estirpe 2b. Neste trabalho a estirpe 2a não foi detectada. Noutro estudo nacional realizado no centro do país, cerca de metade das amostras fecais recolhidas indicavam infecção por PVC-2c, o que sugere uma substituição das anteriores estirpes a e b e uma generalização da estirpe 2c. Neste mesmo trabalho não foi detectada a estirpe 2a, mas é necessária a análise de um maior número de amostras para avaliar a prevalência actual desta estirpe (Decaro *et al.*, 2007a; Vieira *et al.*, 2008).

Apesar de o PVC-2 apenas conseguir infectar membros da família *Canidae*, as estirpes 2a e 2b são capazes de se replicar de forma eficiente em gatos. Cerca de 10% dos isolados de gatos com parvovírus natural são indistinguíveis a nível antigénico destas estirpes (Truyen *et al.*, 1996).

O parvovírus, da família *Parvoviridae*, sub-família *Parvovirinae* é um vírus pequeno e sem invólucro, com cápside icosaédrica, a qual tem 26 nm de diâmetro e é composta por uma combinação de proteínas, VP1, VP2 e VP3 (Decaro *et al.*, 2007a; Berns & Parrish, 2007). A sua cápside contém uma molécula simples e linear de ADN de polaridade negativa e com cerca de 5200 nucleótidos de comprimento, formada por *alternative*

splicing a partir do mesmo ARN. A taxa de mutação do genoma do PVC não foi determinada, no entanto, uma vez que o ADN do PVC é replicado pelas DNA polimerases da célula hospedeira, as quais têm reduzidas taxas de erro, a ocorrência de mutações que afectam as propriedades biológicas dos PVC é muito reduzida. As estimativas sugerem que a taxa de variação é de 1×10^{-4} a 4×10^{-4} alterações/nt/ano (Reed, Jones & Miller, 1988; Cotmore & Tattersall, 1987; Parrish *et al.*, 1991; Truyen *et al.*, 1995).

1.1 Etiologia

Os parvovírus autônomos possuem cápsides pequenas que se unem a receptores celulares específicos. O seu genoma é reduzido, tendo poucos genes que controlam a interação com os receptores celulares dos hospedeiros. O seu tropismo para células e tecidos é determinado em grande parte pela sua capacidade de se ligar e usar os receptores das células hospedeiras e pelo controlo de *splicing* específico do ARN mensageiro viral (ARNm) (Berns & Parrish, 2007).

Apesar de infectarem todas as células do organismo, os viriões replicam-se apenas em células que estejam em processo mitótico, causando danos unicamente nestas. Os parvovírus autônomos necessitam de populações celulares na fase S do ciclo celular, o que traduz uma forte susceptibilidade à doença de hospedeiros mais jovens. As células em divisão são alvo da infecção, porém, o tropismo para células e tecidos específicos condiciona a patogénese da doença. A replicação ocorre inicialmente no tecido linfóide, de onde se dissemina para as criptas do intestino delgado através de virémia. Em cachorros com menos de 4 semanas de idade os viriões têm afinidade para os miócitos, podendo originar miocardite e consequente insuficiência cardíaca (Tennant, 2001; Berns & Parrish, 2007; Sellon, 2005).

Os parvovírus são relativamente simples pelo que têm poucas oportunidades de manipular os receptores celulares ou a resposta imunitária do hospedeiro através de produtos dos genes virais (Berns & Parrish, 2007).

Apesar de existir um papel importante da imunidade mediada por células na recuperação da infecção, a imunidade humoral, incluindo os anticorpos (Ac) maternos ou as IgG administradas passivamente, protege os animais da infecção. Os Ac são relevantes na recuperação da infecção, uma vez que as IgG podem travar a replicação do PVC em cães (Berns & Parrish, 2007).

Os Ac neutralizantes conferem protecção contra muitos parvovírus e a maioria dos animais que recuperam de uma infecção são resistentes a uma reinfecção por vírus relacionados antigenicamente, mesmo que essas variações ocorram num ou mais epítomos. No entanto, em muitas infecções naturais, a existência de um nível reduzido de Ac maternos favorece a infecção por variantes virais antigenicamente diferentes (Berns & Parrish, 2007).

Os viriões são extremamente estáveis e são resistentes a condições ambientais adversas. O PVC-2 é conhecido por permanecer viável em objectos inanimados por períodos superiores 5 meses (McCaw & Hoskins, 2006).

1.2 Gastroenterite causada por Parvovírus

1.2.1 Epidemiologia

Já foi reportada a ocorrência de infecções naturais por parvovírus em cães, cães-domato da América do Sul (*Speothos venaticus*), coiotes (*Canis latrans*) e lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*). A maioria, se não todos os *Canidae* são susceptíveis à infecção por este vírus (McCaw & Hoskins, 2006).

Também foram relatadas infecções naturais noutros animais como o otócion (*Otocyon megalotis*), o ratel (*Mellivora capensis*), a chita (*Acinonyx jubatus*), o tigre siberiano (*Panthera tigris altaica*), o gato-bravo africano (*Felis lybica*), o leão (*Panthera leo*) e o leão-marinho (*Eumetopias jubatus*) (Steinel, Munson, van Vuuren & Truyen, 2000; Driciru *et al.*, 2006; Burek *et al.*, 2005).

A exposição pode ocorrer através do contacto com cães ou gatos infectados ou com o vírus presente no meio ambiente. O PVC-2 é altamente contagioso e a maioria das infecções resultam do contacto com fezes contaminadas no meio ambiente. Para além disto, as pessoas, os instrumentos e objectos (equipamentos em instalações veterinárias ou de tosquia), os insectos e os roedores servem de vectores. Os cães podem ser portadores do vírus no pêlo durante períodos prolongados (McCaw & Hoskins, 2006; Tennant, 2001).

O vírus é ubiqüitário e resistente, suportando uma grande amplitude de temperaturas e condições ambientais. As partículas virais presentes nas fezes podem manter-se contagiosas a temperaturas baixas (-7°C) durante meses a anos. A persistência do vírus no meio ambiente é atribuída à sua resistência e à excreção por animais infectados de forma subclínica. A sua eliminação por animais infectados de forma aguda ou subclínica ocorre até ao 14º dia pós-infecção (Gordon & Angrick, 1988; Kennedy, Mellon, Caldwell & Potgieter, 1995; Smith-Carr, Macintire & Swango, 1997; Tennant, 2001).

O período de incubação (PI) do PVC-2 na doença natural é de 7-14 dias, enquanto que experimentalmente é de 4 a 5 dias, tendo sido observado por Potgieter, Jones, Patton e Webb-Martin algumas diferenças entre a doença experimental e a natural. Nas estirpes 2a e 2b o PI pode ser de apenas 4 a 6 dias (Potgieter, Jones, Patton & Webb-Martin, 1981; McCaw & Hoskins, 2006).

Em cães, a infecção com PVC-2 não se traduz necessariamente em doença aparente. Existe uma variação ampla na resposta clínica dos cães à infecção, o que se traduz entre infecção inaparente e doença aguda fatal. A maioria dos animais adultos faz seroconversão sem manifestar sinais clínicos, o que indica que a ocorrência de infecções ligeiras ou inaparentes é comum. Já em animais mais jovens o quadro clínico de enterite pode instalar-se rapidamente. As infecções inaparentes parecem ser as mais frequentes (McCaw & Hoskins, 2006; Sellon, 2005).

A taxa de mortalidade é elevada em cães não vacinados, principalmente em cachorros de idade compreendida entre 1 e 6 meses. A mortalidade pode variar entre 10 a 90%. Está descrita a uma taxa de sobrevivência de cerca de 64% com tratamento e de 9,1% na sua ausência (Lamm & Rezabek, 2008; Sellon, 2005; Glickman, Domanski, Patronek & Visintainer, 1985; Kariuki, Njenga, Nyaga, Buoro *et al.*, 1990).

O quadro de enterite aguda por PVC-2 pode surgir em cães de qualquer raça, idade ou género. Porém, existem factores que predis põem à ocorrência de quadros clínicos mais graves, como a idade do animal, existência de stress, composição genética (com variações de susceptibilidade para diferentes raças), infecções concomitantes devidas a parasitas intestinais ou bactérias, presença de Ac maternos, estado vacinal, “stress intestinal “ e a magnitude e duração do estado de virémia (McCaw & Hoskins, 2006; Appel, Cooper, Greisen e Carmichael 1978; Sellon, 2005; Tennant, 2001).

Os trabalhos realizados por Houston, Ribble e Head evidenciaram a existência de maior probabilidade de desenvolvimento de quadros de gastroenterite nas raças Rottweiler, American Pit Bull Terrier, Doberman Pinscher e Pastor Alemão e de menor risco nas raças Caniche Toy e Cocker, comparando com animais sem raça definida.

Outros estudos revelaram risco acrescido também para as raças Retriever do Labrador, American Staffordshire Terrier, Springer Spaniel e Husky Siberiano (Bruner & Swango, 1985; Glickman *et al.*, 1985; Smith-Carr *et al.*, 1997; McCaw & Hoskins, 2006).

Os animais da raça Retriever do Labrador com pelagem preta são aparentemente atingidos de forma mais grave. Foi sugerido que a doença de Von Willebrand em cães das raças Dobermann e Rottweiler possa ser um factor importante no aumento da susceptibilidade à infecção por PVC-2 (Sellon, 2005).

Em animais com mais de 6 meses de idade, os machos inteiros têm o dobro da probabilidade de desenvolver enterite por PVC-2 em comparação com fêmeas inteiras (Houston, Ribble & Head, 1996).

Os sinais clínicos são agravados em cachorros que estejam parasitados por helmintas intestinais, protozoários e/ou algumas bactérias entéricas como *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp (McCaw & Hoskins, 2006).

Os Ac maternos protegem os cachorros da infecção ou reduzem a gravidade da doença até perto das 12 semanas. Nalguns casos estes Ac podem deixar de conferir protecção a partir das 8 semanas. A incidência de miocardite por PVC-2 é reduzida devido à influência protectora dos Ac maternos (Tennant, 2001).

A elevada incidência em cachorros que foram recentemente realojados pode estar relacionada em parte com “stress intestinal”. Os cachorros podem mostrar-se relutantes em alimentar-se em ambientes novos, o que resulta num *turn-over* de enterócitos baixo. Uma vez começando a comer, o *turn-over* de enterócitos aumenta, providenciando um ambiente mais favorável à instalação de infecção (Tennant, 2001).

1.2.2 Patogénese

O PVC-2 difunde-se rapidamente entre os animais por via oronasal. Devido à capacidade de subsistência prolongada no meio ambiente, os fomites e a contaminação ambiental também desempenham um papel importante na transmissão do vírus (McCaw & Hoskins, 2006; Sellon, 2005).

Após a inalação ou ingestão, o vírus atinge as células do tecido linfóide faríngeo ou do tecido linfóide intestinal. Seguidamente, infecta todas as células do organismo, no entanto, as maiores alterações ocorrem nos tecidos cujas células têm um elevado ritmo mitótico. Contudo, o parvovírus tem tropismo para células com receptores virais, pelo que as populações celulares de rápida proliferação não são afectadas de forma igual (Tennant, 2001; Pletcher, Toft, Frey & Casey, 1979; Smith-Carr *et al.*, 1997).

A replicação viral começa no tecido linfóide da orofaringe, linfonodos (LN) mesentéricos e timo e seguidamente o vírus dissemina-se para as criptas intestinais através da virémia (McCaw & Hoskins, 2006).

Em cachorros em idade neo-natal as células infectadas são as da medula óssea, do tecido linfóide, do epitélio intestinal e do coração. Nos animais mais velhos as células afectadas são as mesmas, à excepção das cardíacas. A infecção geralmente provoca depleção linfóide, leucopénia, diarreia grave e necrose das criptas intestinais. O factor determinante da gravidade da doença aparenta ser a taxa de *turn-over* linfóide e intestinal (Smith-Carr *et al.*, 1997; Tennant, 2001).

Normalmente as células epiteliais das criptas intestinais atingem a maturação no intestino delgado (ID) e posteriormente migram do epitélio germinativo das criptas para os topos das vilosidades. Uma vez aí, as células epiteliais intestinais adquirem capacidade de absorção (McCaw & Hoskins, 2006).

O parvovírus infecta o epitélio germinativo das criptas intestinais, causando destruição e colapso do epitélio e encurtamento das vilosidades, o que provoca má absorção/má digestão (McCaw & Hoskins, 2006; Macintire & Smith-Carr, 1997).

O PVC-2 também destrói os precursores dos leucócitos circulantes (que são mitoticamente activos) e células linfóides. Em infecções graves isto resulta frequentemente em neutropénia e linfopénia (McCaw & Hoskins, 2006).

No ano de 2007, Decaro, Martela, Elia, Desario, Campolo, Lorusso, Colaianni, Lorusso e Buonavoglia analisaram diferentes tecidos de cães infectados naturalmente com as 3

principais variantes de PVC-2 (PVC-2a, 2b e 2c). Foi demonstrada a presença de PVC em todos os tecidos analisados (encéfalo, cerebelo, bulbo cerebral, tonsilas, LN retrofaríngeos e mesentéricos, timo, miocárdio, pulmão, fígado, baço, rim, bexiga, medula óssea, jejuno, cólon e recto), o que evidencia uma distribuição generalizada dos viriões pelo organismo. As cargas virais mais elevadas foram encontradas nos tecidos linfóides, com cargas de ADN viral máximas observadas nas tonsilas dos animais infectados com PVC-2c e no baço dos animais infectados com PVC-2b. Foram registadas cargas de ADN muito elevadas na medula óssea de cães infectados com PVC-2a.

O tracto urinário foi o tecido com menor carga viral de PVC-2. Foi também registada a existência de ADN viral em tecidos nervosos, incluído o encéfalo, cerebelo e bulbo cerebral em todos os cães em estudo (Decaro *et al.*, 2007c).

As lesões causadas na mucosa intestinal permitem a translocação e o sobrecrecimento bacteriano. A parede das bactérias gram-negativas contém endotoxinas (lipopolissacarídeos – LPS) que são potentes mediadores de inflamação sistémica. A existência de lesões intestinais concomitantes à leucopénia facilita a instalação de infecções secundárias por gram-negativos e pela microflora anaeróbica, o que origina complicações adicionais. O choque endotoxínico resultante é caracterizado por sinais clínicos como hipotermia, CID e icterícia, e pode evoluir para choque séptico e SRIS (Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica) (Macintire & Smith-Carr, 1997; Wessels & Gaffin, 1986; Tennant, 2001; McCaw & Hoskins, 2006).

A endotoxémia e o factor de necrose tumoral α (TNF α) podem ser tão ou mais importantes que a bacteriémia na progressão dos sinais clínicos. A instalação de bacteriémia não é necessária para o desenvolvimento de sinais clínicos e para a mortalidade associada a sépsis ou ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome* – Síndrome Respiratório Agudo Grave). A existência de endotoxémia foi reportada em animais com infecção por PVC-2 natural e experimental. Num estudo realizado em 1989 por Isogai, Isogai, Onuma, Mizukoshi, Hayashi e Namioka, 82% dos cães com enterite por PVC-2 possuíam endotoxina a níveis mensuráveis em circulação. A endotoxémia constitui um potente estímulo para a resposta inflamatória e à medida que esta progride o estado de hipercoaguabilidade sistémica pode evoluir para hipocoaguabilidade, com hemorragias associadas a CID (Otto, Drobatz & Soter, 1997;

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference, 1992; Isogai *et al.*, 1989; Otto, Rieser, Brooks & Russell, 2000).

A mortalidade associada com esta doença parece resultar da bacteriémia e endotoxémia (Turk *et al.*, 1990; Isogai *et al.*, 1989).

No seguimento da infecção, surge uma resposta imunitária local e sistémica ao parvovírus. A resposta sistémica é responsável pela protecção do organismo, uma vez que o vírus invade o tracto GI por via sanguínea e não através do epitélio luminal. Os Ac locais, apesar de serem detectados, não são considerados protectores (Meunier, Cooper, Appel, Lanieu & Slauson, 1985; Smith-Carr *et al.*, 1997).

O período de virémia termina quando surgem anticorpos neutralizantes do vírus, o que sucede cerca de 5-7 dias após a infecção. A excreção activa de PVC-2 inicia-se no 3º ou 4º dia após exposição e aumenta até ao 5º ou 6º dia. Geralmente cessa entre o 7º e o 14º dia pós infecção (McCaw & Hoskins, 2006; Tennant, 2001).

O vírus é eliminado nas fezes durante 7 a 10 dias. O desenvolvimento de Ac intestinais locais é provavelmente importante na paragem da excreção fecal de parvovírus (Tennant, 2001; Nara, Winters, Rice, Olsen & Krakowka, 1983; McCaw & Hoskins, 2006).

O título de Ac no soro pode ser detectado nos 3 a 4 dias após a infecção e atinge valores máximos entre o sétimo e o décimo dia. Após a recuperação, o título de Ac pode permanecer relativamente constante pelo menos durante um ano e é mantido em níveis elevados pelo menos durante dois anos (Tennant, 2001; McCaw & Hoskins, 2006).

1.2.3 Sintomatologia

Raramente todos os sinais clínicos característicos de infecção por parvovírus estão presentes em simultâneo, sendo que os que surgem de início não são específicos e incluem anorexia, depressão, letargia e febre. Em 24 a 48 horas os cachorros mais afectados iniciam o vômito e podem desidratar rapidamente. A ocorrência de hipertermia é também expectável. A enterite por PVC pode progredir rapidamente, especialmente nas infecções pelas novas estirpes de PVC-2 (McCaw & Hoskins, 2006; Macintire & Smith-Carr, 1997; Appel *et al.*, 1978; Tennant, 2001).

O vômito é geralmente grave e de duração prolongada, sendo usualmente seguido pelo aparecimento de diarreia. A emese é fruto da irritação local e da activação central do centro de vômito e da CTZ (*chemoreceptor trigger zone*). A inflamação gastrointestinal local causa estimulação do nervo vago e dos nervos toracolombares viscerais aferentes. A activação central é causada pela libertação de mediadores humorais associados à endotoxémia e às citoquinas (McCaw & Hoskins, 2006; Washabau & Elie, 1995).

A diarreia é profusa, podendo ser ou não hemorrágica. As fezes têm tonalidade cinzenta clara ou amarela-acinzentada no início da doença e com a sua progressão podem adquirir laivos ou tornar-se escura devido à presença de sangue (Tennant, 2001; McCaw & Hoskins, 2006).

Figura 1 – a) - Canídeo de raça indeterminada, 14 meses de idade, com parvovirose. Aspecto de diarreia hemorrágica. b) – Canídeo de raça Epagneul Bretão, 20 meses de idade, com parvovirose. Aspecto de diarreia hemorrágica.



Figura 1a



Figura 1b

A presença de fezes fluidas com laivos de sangue ou francamente hemorrágicas pode ser o primeiro sinal a surgir, podendo persistir até à recuperação ou à morte.

Figura 2 – Dejecção diarreica de canídeo com parvovirose. De notar a presença de coágulos sanguíneos.



Alguns cães, especialmente os cachorros, podem atingir temperaturas corporais de 40-41°C. Os mais velhos podem estar normotérmicos ou apenas ligeiramente hipertérmicos (Appel *et al.*, 1978).

Os animais podem apresentar-se com cianose das membranas mucosas, pulso femoral fraco e com respiração rápida e superficial (Pletcher *et al.*, 1979).

Não existem sinais radiográficos específicos. A existência de radiolucência na porção proximal do cólon descendente e de distensão gasosa do estômago são sinais radiográficos frequentes e que podem mimetizar uma obstrução intestinal. A radiografia e a ecografia abdominal podem ser utilizadas para investigar a presença de um corpo estranho que justifique os sinais clínicos ou a existência de invaginação intestinal. À punção abdominal obtém-se um fluido ascítico amarelado. A exploração laparoscópica revela LN mesentéricos aumentados de volume e congestão e dilatação de vasos mesentéricos (Macintire & Smith-Carr, 1997; Pletcher *et al.*, 1979; Sellon, 2005).

A alteração da motilidade do tracto GI predispõe os animais afectados à ocorrência de íleus paralítico e invaginação intestinal. Com a instalação de desidratação grave, perda de proteína, infecção concomitante e incapacidade de produção de uma resposta imunitária rápida, este síndrome pode progredir rapidamente para choque sistémico e morte. A morte pode ocorrer ao fim de dois dias após o início de doença clínica, em particular em animais jovens, como consequência de desidratação, choque endotoxínico, alterações electrolíticas e infecção bacteriana secundária (Macintire & Smith-Carr, 1997; Mantione & Otto, 2005; Tennant, 2001; McCaw & Hoskins, 2006; Sellon, 2005).

O desenvolvimento de hipotermia, icterícia ou CID pode surgir em fase terminal nos animais em choque séptico.

Figura 3 – Canídeo de raça Epagneul Bretão, 20 meses de idade, com parvovirose, em hipotermia por septicémia.



A gravidade do quadro clínico pode agravar-se por factores como stress, sobrepopulação, más condições sanitárias, infecção bacteriana secundária e doenças concomitantes, como a esgana, salmonelose, campilobacteriose, clostridiose e parasitismo. Estes agentes podem desencadear septicémia e/ou endotoxémia (Turk *et al.*, 1992; Sandstedt & Wienup, 1981; Sellon, 2005; Macintire & Smith-Carr, 1997).

O PVC-2 pode originar doença neurológica primária, mas mais frequentemente esta acontece como resultado de hemorragia no sistema nervoso central (SNC) devido a CID ou por hipoglicémia que surge no decorrer da doença, por sépsis ou por alterações de ácido-base e electrolíticas. A infecção concomitante com outros vírus como o da esgana é também uma possibilidade (McCaw & Hoskins, 2006).

Já foi observada a presença de eritema multiforme num canídeo com infecção por PVC-2. As lesões cutâneas incluíam ulceração das almofadas plantares, pontos de pressão, boca e mucosa vaginal. Estavam também presentes vesículas na cavidade oral e placas eritematosas no abdómen e região perivulvar. A presença de parvovírus foi confirmada por imunohistoquímica (McCaw & Hoskins, 2006).

Pode desenvolver-se miocardite se a infecção ocorrer *in utero* ou em cachorros com menos de 8 semanas de idade. Geralmente, todos os cachorros de uma ninhada estão afectados. Os cachorros com miocardite causada por PVC-2 frequentemente morrem

após um curto episódio de dispneia. Os sinais de disfunção cardíaca podem anteceder a exibição de sinais de doença entérica ou podem aparecer de forma repentina, sem aparente doença prévia (McCaw & Hoskins, 2006).

O espectro de doença cardíaca é amplo e pode incluir qualquer dos seguintes quadros clínicos: diarreia aguda e morte, sem sinais do foro cardíaco; diarreia e aparente recuperação, seguida de morte, a qual surge semanas ou meses mais tarde como resultado de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) ou início súbito de ICC, a qual ocorre em cachorros entre as 6 semanas e os 6 meses de idade aparentemente normais. Actualmente, ainda é observada de forma ocasional a existência de miocardite em cachorros nascidos de cadelas não vacinadas, em contraste com a elevada frequência encontrada durante os comuns surtos epizooticos na década de 70 em animais PVC-naïfe. A infecção por PVC-2 não aparenta ser uma causa comum de doença cardíaca pois a análise por PCR na necrópsia de 27 cães com cardiomiopatia dilatada ou miocardite não detectou PVC-2 em qualquer das amostras (McCaw & Hoskins, 2006).

Os cães com infecção natural por PVC-2 revelam evidências clínicas e laboratoriais de hipercoaguabilidade. Pode haver alteração dos testes de coagulação, o que inclui prolongamento do tempo de tromboplastina parcial activada, aumento de amplitude de tromboelastograma e redução da actividade de antitrombina III (McCaw & Hoskins, 2006).

Num estudo realizado no ano 2000 por Otto, Rieser, Brooks e Russell observou-se que 8 em 9 animais com enterite por PVC-2 desenvolveram trombose ou flebite associada ao cateter endovenoso. Apesar de não ter sido possível esclarecer o mecanismo primário, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a redução na actividade de antitrombina III e o aumento da concentração de fibrinogénio são factores que provavelmente contribuem para o desenvolvimento precoce de hipercoaguabilidade em cães com enterite por PVC. Neste mesmo estudo concluiu-se que os animais com enterite por PVC-2 têm uma maior prevalência de trombose ou flebite clínica e evidências laboratoriais de hipercoaguabilidade sem CID (Otto *et al.*, 2000).

A instalação de infecção do tracto urinário (ITU) assintomática foi detectada em cerca de 25% dos animais após enterite por PVC-2. Esta infecção foi atribuída a contaminação fecal dos órgãos genitais externos em associação com a neutropénia. A ITU subclínica que não receba tratamento pode originar infecção urinária crónica (McCaw & Hoskins, 2006).

Já foram isoladas bactérias ambientais ou provenientes do tracto GI a partir de cateteres endovenosos de cães com suspeita de infecção por PVC-2. A maioria destes organismos é do tipo gram-negativo (*Serratia*, *Acinobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*). Apesar dos resultados positivos das culturas de pontas dos cateteres, nenhum dos animais mostrou sinais clínicos sistémicos de infecção e apenas um desenvolveu flebite local (McCaw & Hoskins, 2006).

Em 1990, Turk, Miller, Brown, Fales, Fischer, Gosser, Nelson, Shaw e Solorzano reportaram o isolamento de *Escherichia coli* a partir de tecido pulmonar ou hepático de 90% dos cães que morreram com parvovírus e alterações compatíveis com ARDS. Estas descobertas implicam que as lesões de origem viral sofridas pelo tracto GI aumentam o risco de translocação bacteriana intestinal, septicémia por bactérias do género *coli* e infecção de tecido local, bem como a ocorrência de SRIS e morte (Turk *et al.*, 1990).

1.2.4 Parâmetros laboratoriais

A alteração hematológica mais consistente na infecção por parvovírus é a linfopénia transitória (Pletcher *et al.*, 1979; Brunner & Swango, 1985; Macartney, McCandlish, Thompson & Cornwell, 1984).

As análises bioquímicas não são específicas. A perda grave de potássio devida a anorexia, vômito e diarreia pode contribuir para a depressão e fraqueza. A desidratação pode originar elevação da ureia e creatinina e pode também registar-se um aumento da fosfatase alcalina sérica e da alanina transaminase como consequência de hipoxia hepática secundária à grave hipovolémia. É possível que ocorram outras anomalias electrolíticas como consequência do vômito e diarreia graves, as quais devem ser monitorizadas (Macintire & Smith-Carr, 1997).

O valor de hematócrito encontra-se geralmente normal ou ligeiramente reduzido, o que ajuda à distinção clínica entre esta doença e a gastroenterite hemorrágica (GEH). Na GEH há profunda hemoconcentração, a qual causa valores de hematócrito marcadamente elevados (Sellon, 2005; Tennant, 2001).

A anemia é devida à perda de sangue através das fezes ou está associada à presença de parasitas, e pode manifestar-se como anemia com pan-hipoproteínemia (Macintire & Smith-Carr, 1997).

O número de eritrócitos circulantes não aparenta ser afectado uma vez que as células maduras possuem uma semi-vida mais longa comparativamente ao curto período durante o qual o vírus provoca supressão medular (Potgieter *et al.*, 1981).

A infecção com PVC-2 resulta no aparecimento de linfopénia, neutropénia ou panleucopénia (Potgieter *et al.*, 1981). A leucopénia, em particular a neutropénia, ocorre nos casos graves (Macintire & Smith-Carr, 1997; McCaw & Hoskins, 2006; Sellon, 2005).

Em 1981, Potgieter, Jones, Patton e Webb-Martin observaram que animais infectados experimentalmente e sem sinais clínicos apenas desenvolveram linfopénia.

O aparecimento de leucopénia é uma característica muito comum da infecção por parvovírus, especialmente nos primeiros 4 a 5 dias de doença (Appel *et al.*, 1978). Podem ser atingidos valores inferiores a 100 células/mm³, mas geralmente variam entre 500 a 2000 células/mm³ no pico de doença (Appel *et al.*, 1978). A leucopénia é um factor constante, apesar de não ocorrer em todos os cães. É usualmente proporcional à

gravidade e estado da doença na altura em que é feita a colheita de sangue (McCaw & Hoskins, 2006; Sellon, 2005).

A neutropénia pode ser profunda em infecções por PVC-2. Neutropénia grave a moderada foi observada na doença natural. A redução dramática de neutrófilos circulantes parece ser resultante da interrupção da produção na medula óssea. Apesar de passageira esta diminuição é importante, uma vez que a semi-vida dos neutrófilos é muito reduzida (Appel *et al.*, 1978; Potgieter *et al.*, 1981).

A extensa lesão dos tecidos despoleta uma grande necessidade de neutrófilos, mas há depleção de neutrófilos maduros circulantes causada por marcada perda destes leucócitos através da parede intestinal lesionada. É provável que o epitélio intestinal lesado na doença por PVC-2 requeira uma notável resposta dos neutrófilos, a qual, uma vez que ocorre simultaneamente à interrupção da produção na medula óssea, pode contribuir como factor para a depleção de neutrófilos (Sellon, 2005; Potgieter *et al.*, 1981).

A recuperação da infecção está associada a leucocitose transitória, a qual é devida principalmente a linfocitose. A leucocitose é coincidente com o período de convalescença, rápida produção de anticorpos e fim da eliminação fecal de vírus. A normalização do leucograma é um indicador útil de recuperação iminente (Potgieter *et al.*, 1981; Sellon, 2005).

A leucocitose pode atingir níveis tão elevados como 33.000 por μm^3 , valores que podem causar confusão no diagnóstico, especialmente com doenças neoplásicas como a leucemia. A característica importante da linfocitose causada por PVC-2 é ter carácter passageiro (Potgieter *et al.*, 1981).

1.2.5 Necrópsia

A nível macroscópico, as lesões mais evidentes estão normalmente confinadas ao intestino delgado. Inicialmente são mais pronunciadas no duodeno distal e numa fase posterior o jejuno é a porção mais atingida. Em casos ligeiros, as lesões não são fáceis de distinguir das causadas por enterite não específica (Boosinger, Rebar, DeNicola & Boon, 1982; McCaw & Hoskins, 2006).

A parede intestinal está espessada na generalidade e com descoloração em alguns segmentos. Pode existir emaciação e grande volume de fluido mucóide esverdeado ou escuro com laivos de sangue no estômago e nos dois terços proximais do intestino delgado. A mucosa do ID pode encontrar-se hiperémica e com ulcerações multifocais. O conteúdo luminal geralmente é aquoso, com odor fétido e pode conter porções de mucosa intestinal (McCaw & Hoskins, 2006; Potgieter *et al.*, 1981; Boosinger *et al.*, 1982).

Ocorre hiperplasia e edema de LN mesentéricos e torácicos e é possível haver acumulação de pequeno volume de líquido livre ascítico de tom amarelado no abdómen (Pletcher *et al.*, 1979; McCaw & Hoskins, 2006).

O miocárdio pode apresentar-se sem alterações ou com sinais de miocardite, com presença de bandas pálidas. Estas lesões consistem numa miocardite não-supurativa com infiltração multifocal de linfócitos e de células plasmáticas (Potgieter *et al.*, 1981; McCaw & Hoskins, 2006).

Ao exame histopatológico é possível observar alterações em vários órgãos. O tecido esplénico está geralmente alterado por uma depleção linfoplasmocítica difusa ligeira a moderada da polpa vermelha, com presença de hemorragia e necrose linfóide dos folículos (Pletcher *et al.*, 1979).

A necrose dos linfócitos nos LN mesentéricos origina uma depleção linfóide dos folículos e substituição por células reticulares grandes semelhantes a macrófagos com citoplasma eosinofílico. As áreas paracorticais e as cordas medulares encontram-se hipocelulares. As placas de Peyer e o timo usualmente estão afectadas de forma semelhante (Pletcher *et al.*, 1979; McCaw & Hoskins, 2006).

O tecido pulmonar pode estar normal ou pode observar-se edema pulmonar ou alveolite em animais que sofram septicémia concomitante (Potgieter, *et al.*, 1981; McCaw & Hoskins, 2006).

As lesões mais graves encontram-se no íleo. Observa-se necrose da superfície nalgumas áreas, atrofia ou obliteração das vilosidades e necrose das criptas epiteliais na mucosa do intestino delgado. Consequentemente, como não ocorre substituição epitelial, resulta no colapso da lâmina própria. Em casos mais avançados pode dar-se regeneração de epitélio e a lâmina própria pode estar infiltrada por células inflamatórias. Ocorre extensa necrose do epitélio das criptas e ulceração da mucosa, particularmente sobrejacente às placas de Peyer e podem observar-se pequenos focos de neutrófilos adjacentes a criptas necróticas (Nelson, Eustis, McAdaragh & Stotz, 1979; Pletcher *et al.*, 1979; McCaw & Hoskins, 2006; Appel *et al.*, 1978; Boosinger *et al.*, 1982).

As criptas de Lieberkühn estão desprovidas de células epiteliais e com o lúmen vazio, com conteúdo celular necrótico, muco ou fibrina. Existe um grande número de criptas revestidas por células epiteliais grandes e de forma irregular (Pletcher *et al.*, 1979).

Existe um número elevado de formas mitóticas nos enterócitos das criptas. Alguns enterócitos podem conter estruturas intracelulares sugestivas da existência de inclusões virais, mas a semelhança destas com nucléolos hipertrofiados dificulta a diferenciação (Pletcher *et al.*, 1979).

Ocorre redução de tamanho e alongamento de muitos enterócitos, de forma a que menos células cobrem uma ampla área de superfície. Geralmente, os vasos das camadas submucosa e muscular encontram-se com congestão moderada e pode haver alguma hemorragia (Pletcher *et al.*, 1979; Potgieter *et al.*, 1981).

As células epiteliais das criptas no intestino grosso não sofrem nenhuma das alterações descritas para o intestino delgado (Pletcher *et al.*, 1979).

Também existem alterações observáveis em esfregaço de medula óssea. A infecção a parvovírus provoca mudanças nas linhas celulares mielóide e eritróide e nos megacariócitos. Ocorre uma grave depleção granulocítica e uma ligeira depleção eritróide das células perto de atingir a maturidade. O pool de armazenamento mielóide de neutrófilos maduros é afectado de forma grave (Pletcher *et al.*, 1979; Potgieter *et al.*, 1981).

Há hiperplasia marcada dos precursores granulócitos de neutrófilos com um desvio à esquerda (predomínio de mielócitos e progranulócitos). Poucos metamielócitos e ainda menor número de neutrófilos imaturos subsistem (Pletcher *et al.*, 1979; Potgieter *et al.*, 1981).

Estão presentes evidências de toxicidade e degenerescência da série mielóide, dada pela basofilia e vacuolização do citoplasma, dilatação e hialinização nuclear e pela presença de neutrófilos imaturos gigantes com núcleos em anel (Boosinger *et al.*, 1982).

A série eritróide é normalmente a predominante e apresenta a sua sequência de maturação normal. O citoplasma de megacariócitos encontra-se frequentemente muito vacuolizado. Surge um aumento dos macrófagos medulares e a eritrofagocitose é um acontecimento comum. A fagocitose de neutrófilos também ocorre. Podem também ser observados linfócitos medulares, células plasmáticas e linfócitos reactivos (Boosinger *et al.*, 1982).

As alterações mencionadas evidenciam extrema toxicidade medular e reactividade com aumento de *turn-over* e destruição de elementos normais. Estas lesões representam a morfologia da medula óssea numa altura concreta e podem mudar drasticamente com a progressão da doença. As lesões não são específicas; podem traduzir o efeito tóxico directo do parvovírus nas células medulares precursoras, apesar de se observar alterações semelhantes em cães que sucumbiram com septicémia (Boosinger *et al.*, 1982).

1.2.6 Diagnóstico

O diagnóstico clínico de infecção por PVC-2 é equívoco, uma vez que existem outros agentes patogénicos que causam gastroenterite em cães. Assim sendo, o diagnóstico clínico deve ser sempre confirmado por testes laboratoriais. O diagnóstico definitivo de enterite por parvovírus requer a demonstração de excreção activa de vírus nas fezes ou análise serológica de IgM específica como prova de infecção recente (Sellon, 2005).

Quando este vírus emergiu, recorria-se à quantificação dos títulos de IgM e IgG séricos para a detecção de infecção. A existência de um título de IgM elevado com um título de IgG baixo a negativo em cães com diarreia sanguinolenta determinava a presença de infecção aguda. Porém, estes testes não podiam ser utilizados na diferenciação entre infecção subclínica prévia, infecção activa ou vacinação (Macintire & Smith-Carr, 1997).

Existem dois tipos de teste para o diagnóstico de PVC-2 agudo. O primeiro é baseado em serologia – geralmente estão presentes anticorpos no soro no início dos sinais clínicos. A sua presença pode ser considerada como diagnóstico de PVC-2 em cães não vacinados com sinais clínicos. O segundo método de diagnóstico de PVC-2 é baseado na detecção de antígenos nas fezes dos cães (Appel, 1969).

As fezes diarreicas de cães podem ser analisadas por métodos ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), Imunocromatografia (IC) ou Hemaglutinação (HA), mas estas técnicas têm uma sensibilidade relativamente baixa (Mochizuki, San Gabriel, Nakatani, Yoshida & Harasawa, 1993b; Uwatoko, Sunairi, Nakajima & Yamaura, 1995; Esfandiari & Klingeborn, 2000).

Existem testes antigénicos ELISA fecais disponíveis para testagem intra-hospitalar do PVC-2. Este método de IC é o teste rápido de campo mais usado. Tem um procedimento simples e célere, o qual pode ser realizado por Médicos Veterinários ou pelos proprietários dos animais. Uma vez que fornece o resultado rapidamente, é possível isolar e o iniciar o tratamento de um animal portador de infecção quando os seus sinais clínicos ainda são vagos (Esfandiari & Klingeborn, 2000; Macintire & Smith-Carr, 1997).

Os testes fecais de eliminação viral são baseados no facto de, durante a doença aguda, os cães eliminarem quantidades maciças de vírus nas fezes. No entanto, o período de eliminação fecal de vírus é breve e estes raramente são detectados após o 10º a 12º dia de infecção, o que corresponde ao 5º a 7º dia de manifestação clínica da doença. Para que se produza uma lista claramente visível são necessárias grandes quantidades de antígeno viral e a interpretação do resultado pode ainda ser afectada pela subjectividade do operador. Isto é particularmente comum quando a quantidade viral excretada é baixa (Sellon, 2005; McCaw & Hoskins, 2006; Desario *et al.*, 2005).

Os resultados positivos confirmam a infecção ou podem ser causados por vacinas atenuadas vivas de PVC-2. As vacinas virais atenuadas originam eliminação fecal do vírus, o que gera um resultado falso positivo durante 5 a 12 dias após vacinação. As reacções vacinais geralmente produzem fracos positivos em comparação com a infecção natural (Macintire & Smith-Carr, 1997; McCaw & Hoskins, 2006).

Os testes de ELISA negativos não excluem a possibilidade de infecção por PVC-2, uma vez que podem surgir falsos negativos devido à ligação do antígeno do teste com os Ac neutralizantes presentes na diarreia (Macintire & Smith-Carr, 1997; McCaw & Hoskins, 2006).

Em 1969 Appel sugeriu a utilização do teste ELISA dot para pesquisa de IgG para avaliação do estado de imunização de cachorros após a vacinação. Foi também proposto o uso de um kit de IgM para detectar casos de infecção em fase inicial, recorrendo a uma única amostra de soro (Florent, 1986; Waner, Mazar, Nachmias, Korn-Kornblatt & Harus, 2002).

Num estudo respeitante ao diagnóstico de parvovirose aguda realizado em 2004 por Waner, Keren-Kornblatt, Shemesh e Mazar, observou-se que todos os animais participantes possuíam IgG e IgM no soro, enquanto que em apenas 20% dos cães foi confirmada a excreção fecal de antígeno de PVC. A razão para o sucesso relativamente baixo do kit de antígeno fecal não é clara, mas é possível que esteja relacionado com a ligação de anticorpos do tracto intestinal aos viriões de parvovírus, inibindo a sua detecção por métodos imunocromatográficos (Sellon, 2005; Waner *et al.*, 2004). Neste mesmo estudo, concluiu-se que o método ELISA dot é um teste fidedigno para a pesquisa de IgG e IgM em condições de infecção natural.

Presentemente estão a ser desenvolvidos testes ELISA especializados (como ELISA indirecto, ELISA de competição e ELISA *double sandwich*) para a detecção no soro de Ac específicos contra o PVC, os quais são alegadamente mais sensíveis que a Inibição de Hemaglutinação (Macintire & Smith-Carr, 1997).

Recentemente surgiram preocupações acerca da capacidade da detecção da nova estirpe 2c por parte dos testes rápidos de uso hospitalar. No ano 2010, Decaro, Desario, Beall, Cavalli, Campolo, DiMarco, Amorisco, Colaianni e Buonavoglia demonstraram a capacidade de detecção da estirpe 2c dos referidos testes. No entanto, e considerando a elevada sensibilidade dos métodos moleculares, a abordagem recomendada por estes autores para o diagnóstico de parvovírus é recorrer inicialmente aos testes rápidos e, em casos questionáveis, enviar amostras fecais para o laboratório para a realização de testes baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Kapil *et al.*, 2007; Decarro *et al.*, 2010).

Os parvovírus causam, regra geral, hemaglutinação dos eritrócitos. O teste de Hemaglutinação fecal, baseado nas propriedades distintas de hemaglutinação dos parvovírus, determina a diluição mais elevada (título) na qual as fezes do paciente aglutinam eritrócitos de macaco ou de suíno, a qual serve de medida para o nível de vírus no espécimen fecal (McCaw & Hoskins, 2006; Sellon, 2005).

A Inibição da Hemaglutinação (IH) por soro anti-PVC-2 pode ser usada na demonstração de existência de anticorpos no soro. A existência de um título de IH elevado numa só amostra de soro colhida após um animal ter estado clinicamente doente durante 3 ou mais dias serve de diagnóstico da infecção. Títulos de IH superiores a 1:256 são considerados como indicativos de exposição ao PVC. Para a protecção contra PVC é necessário existir um título de IH de pelo menos 1:80 (McCaw & Hoskins, 2006; Mann, Bush, Appel, Beehler & Montali, 1980; Kramer, Meunier & Pollock, 1980).

Nos cães domésticos os títulos de IH são geralmente bastante elevados na altura de infecção (1:640 – 1:10.240), mas não costumam aumentar durante o período de convalescença, persistindo durante meses (Kramer *et al.*, 1980).

A existência de seroconversão também pode ser demonstrada se forem comparadas amostras de soro colhidas na fase aguda, no dia 10º e no 14º dia de convalescença, utilizando parvovírus quer canino quer felino em testes de IH ou de Neutralização Viral (NV) (McCaw & Hoskins, 2006).

A HA e o Isolamento Viral (IV) são testes que só podem ser executados por laboratórios especializados. Os testes de HA requerem eritrócitos frescos e os seus resultados podem ser lidos ao fim de 4 horas. A HA é pouco sensível, dado que são necessárias elevadas

quantidades de vírus para gerar hemaglutinação induzida por PVC-2 (Desario *et al.*, 2005; Decaro *et al.*, 2005).

O IV é mais sensível que a HA, mas é demasiado laborioso e demorado (5-10 dias) para ser utilizado como teste diagnóstico rotineiro. Este método requer disponibilidade de culturas celulares que só podem ser propagadas em laboratórios com pessoal especializado e com capacidade de efectuar culturas celulares. A titulação viral em culturas celulares é trabalhosa e não aplicável como exame de rotina, uma vez que o isolamento viral em culturas celulares não é possível para todas as estirpes de PVC-2. Além disso, uma vez que várias estirpes de PVC-2 não causam efeitos citopáticos evidentes, a presença de antígeno viral nas culturas celulares tem de ser comprovada por Imunofluorescência (IF - As células infectadas com parvovírus são marcadas com um reagente de anticorpos fluorescente) ou HA, o que implica perda de tempo adicional (Mochizuki *et al.*, 1993b; Desario *et al.*, 2005; Boosinger *et al.*, 1982; Decaro *et al.*, 2005).

A maior desvantagem dos métodos de HA e IV é, no entanto, a baixa sensibilidade, possivelmente devida à presença de anticorpos no lúmen intestinal dos animais infectados que se podem ligar aos viriões e impedir tanto a hemaglutinação como a ligação viral aos receptores celulares. Foi demonstrado no ano de 2005 por Decaro, Elia, Martella, Desario, Campollo, Di Trani, Tarsitano, Tempesta e Buonavoglia que, em infecções naturais e experimentais, o PVC-2 é detectado por HA e/ou IV apenas durante alguns dias pós infecção, fazendo com que essas técnicas possam originar resultados falsos negativos, mesmo havendo grande quantidade de ADN viral detectado por RT-PCR (Desario *et al.*, 2005; Decaro *et al.*, 2005).

Assim, se recorrermos a HA ou a isolamento em culturas celulares, a infecção por PVC-2 pode ser erradamente diagnosticada e a carga viral nas fezes diarreicas pode não ser quantificada correctamente. Como consequência, é possível que cães infectados de forma subclínica ou que estejam a recuperar de infecção por PVC-2 não sejam identificados. Isto resulta em contaminação do ambiente e disseminação da infecção (Decaro *et al.*, 2005).

Também se pode recorrer a métodos imunoquímicos para a detecção de vírus nas culturas de tecidos ou a pesquisa por microscopia electrónica em fezes ou tecidos, apesar de estes não estarem disponíveis comercialmente. O uso de microscopia

electrónica para demonstração de excreção fecal de parvovírus não é funcional na prática clínica (McCaw & Hoskins, 2006; Tennant, 2001; Sellon, 2005).

O vírus pode ser isolado a partir de tecidos lesionados ou de fezes, recorrendo à cultura de tecidos, se for realizado numa fase precoce. Posteriormente, com o decorrer da infecção, os viriões são revestidos por anticorpos e eliminados (McCaw & Hoskins, 2006).

Os métodos baseados na detecção de ADN por PCR revelaram-se altamente sensíveis, podendo reduzir o número de resultados falsos negativos que ocorrem com os testes de ELISA fecais. Este método também é útil na diferenciação entre estirpes de PVC-2 virulentas e vacinais (Mochizuki *et al.*, 1993b; Uwatoko *et al.*, 1995; Macintire & Smith-Carr, 1997; Pereira *et al.*, 2000; Buonavoglia *et al.*, 2001; Desario *et al.*, 2005; McCaw & Hoskins, 2006).

O método RT-PCR, utilizado para avaliar a carga de ADN viral, mostrou ter igual sensibilidade para todas as estirpes de PVC-2 (Desario *et al.*, 2005).

Estudos prévios revelam que os testes de uso intra-hospitalar, bem como os métodos de diagnóstico utilizados de forma comum para a detecção de PVC como a HA e o IV, são menos sensíveis que o PCR (convencional e *real-time*) e dificilmente detectam estirpes de vacinas vivas modificadas, apesar de serem altamente específicos (Desario *et al.*, 2005).

Recentemente, foi desenvolvida uma análise de RT-PCR com o intuito de detectar e quantificar o ADN de PVC-2 em amostras fecais, a qual foi considerada como *gold standart* no diagnóstico de infecção por PVC-2 (Decaro *et al.*, 2005; Desario *et al.*, 2005). Este método, com base na tecnologia TaqMan, provou ser muito sensível, específico e reprodutível, sendo também menos demorado que o PCR convencional em gel. Permite a detecção e quantificação de ácido nucleico de PVC-2 em algumas horas. Apesar de permitir a rápida detecção de PVC-2, não identifica a variante, o qual é conseguido recorrendo a outras técnicas morosas como a IH (Decaro *et al.*, 2005).

O método de RT-PCR para a pesquisa de PVC-2 provou ter maior sensibilidade que o PCR convencional baseado na detecção por gel de brometo de etídio, sendo capaz de detectar apenas 10^2 cópias de ADN de PVC-2 (Decaro *et al.*, 2005).

Por esta razão, o RT-PCR possibilita a identificação de animais cujas fezes possuam cargas virais baixas, o que auxilia na adopção de medidas de profilaxia (Decaro *et al.*, 2005).

Esta técnica pode contribuir para um melhor conhecimento da patogénese da infecção por PVC-2, particularmente em relação à duração do período de eliminação e à quantidade de viriões excretados por cães infectados e por animais vacinados. A possibilidade de determinar com precisão a duração do período de eliminação viral e a quantidade de ADN viral excretada é de grande importância na avaliação da eficácia das vacinas. Desta perspectiva, este novo método será extremamente útil para compreender se as diferenças antigénicas entre as estirpes 2a/2b e a estirpe 2 original podem justificar a falha parcial das vacinas baseadas em PVC-2 mais antigas na protecção de cachorros contra as variantes antigénicas em condições naturais ou experimentais (Decaro *et al.*, 2005).

Em contrapartida, as técnicas moleculares, especialmente o RT-PCR, necessitam de equipamento e reagentes onerosos e de operadores especializados. A ideia de ser utilizado como teste intra-hospitalar não é para já plausível (Desario *et al.*, 2005).

A discrepância entre os resultados de HA e RT-PCR pode ser devida ao facto de serem necessárias cargas virais altas para que haja hemaglutinação e ao sequestro frequente dos viriões de PVC-2 por anticorpos específicos no lúmen intestinal (Decaro *et al.*, 2005).

O método de RT-PCR nested foi desenvolvido e testado com o vírus da peritonite infecciosa felina (VPIF), o coronavírus entérico felino (CVEF) e com o vírus da gastroenterite transmissível (VGET) e foi considerado altamente sensível e específico. Foi também demonstrado que o PCR consegue detectar vírus numa concentração baixa, cerca de 10 partículas infecciosas por reacção, o que corresponde a uma carga viral de aproximadamente 10^3 PFU/ml de matéria fecal não processada (Gamble, Lobbiani, Gramegna, Moore & Colucci, 1997; Pratelli, Tempesta, Greco, Martella & Buonavoglia, 1999; Decaro *et al.*, 2005).

Até à data, não se encontra disponível um método universal que identifique todas as estirpes. A evolução contínua do PVC-2 tem sérias implicações nos testes de diagnóstico baseados em Ac monoclonais e PCR (Hong *et al.*, 2007).

É necessário actualizar os métodos de tipificação do PVC-2 baseados em polimorfismo de um único nucleótido, pois mutações adicionais podem prejudicar a correcta

caracterização de estirpes. É necessário continuar a empregar técnicas moleculares de diagnóstico que se direccionem a áreas mais conservadas, evitando assim resultados falsos negativos (Decaro *et al.*, 2006d; Decaro *et al.*, 2009a)

Em 2004, Nakamura, Tohya, Miyazawa, Mochizuki, Phung, Nguyen, Huynh, Nguyen, Nguyen e Nguyen comprovaram que a mutação Glu-426 resulta na estirpe PVC-2c, a qual tem diferenças antigénicas detectadas por anticorpos monoclonais. A evolução contínua deste vírus requer que os métodos de diagnóstico baseados na detecção de um único Ac monoclonal sejam avaliados periodicamente em relação à sua sensibilidade para novas estirpes de PVC-2. De forma semelhante, os testes baseados nos ácidos nucleicos também devem ser continuamente avaliados para assegurar que as mutações não ocorreram nas regiões de ligação de *primers* ou *probes* (Hong *et al.* 2007).

A padronização rigorosa de testes laboratoriais para a detecção de PVC-2 é imperativa para fornecer aos cientistas veterinários uma ferramenta eficaz para um diagnóstico etiológico concreto. A importância do diagnóstico precoce e instauração do tratamento de animais infectados por PVC-2 justifica o emprego de um teste preciso, objectivo e rápido de uso hospitalar (Waner *et al.*, 2004).

1.2.7 Abordagem Terapêutica

Não existe tratamento específico dirigido ao agente da enterite por PVC. Por esta razão a abordagem destes animais baseia-se no tratamento de suporte agressivo dos animais afectados. Geralmente são administrados cristalóides associados ou não a colóides, agentes antimicrobianos e antieméticos (Prittie, 2004).

A identificação precoce de animais que necessitam de tratamento agressivo é crucial para o desfecho clínico (Prittie, 2004).

Os objectivos primários do tratamento de enterite por PVC-2 são a restauração do volume de fluidos e do equilíbrio electrolítico e a prevenção da instalação de infecções secundárias. A fluidoterapia é possivelmente o aspecto individual mais importante na abordagem clínica e deve ser mantida enquanto o vômito e/ou a diarreia persistir e continuada até que seja possível a ingestão por via oral (McCaw & Hoskins, 2006; Macintire & Smith-Carr, 1997).

Uma vez que o tratamento de parvovírus é de suporte e semelhante ao que seria usado na maioria dos animais com gastroenterite grave, a terapia deve ser instituída independentemente da realização de testes de diagnóstico ou da obtenção do seu resultado. A pedra basilar do tratamento é a rehidratação. Na maioria dos casos, recorre-se a fluidoterapia endovenosa com soluções que possuam concentração electrolítica semelhante à plasmática (isotónicas) e possam ser administradas em velocidade. O Lactato de Ringer é uma escolha adequada, sendo muitas vezes suplementado com potássio. Caso surja choque hipovolémico pode ser necessário administrar um bolus endovenoso de até 90 ml/kg/h para restaurar a perfusão (Sellon, 2005; Macintire & Smith-Carr, 1997).

A leucopénia grave existente em muitos animais deve ser tida em consideração quando se pondera a administração de fluidos por via subcutânea, uma vez que existe uma incidência elevada de complicações como infecção, celulite e necrose da pele nos locais de aplicação (Sellon, 2005).

Os animais que estão desidratados mas não em choque devem ser hidratados ao longo de 4 horas e o total de fluidos a administrar é calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Desidratação (\%)} \times \text{peso corporal (kg)} = \text{deficit (L)}$$

O volume de manutenção (2 a 3 ml/kg/h) e o volume das perdas ocorridas no vômito e diarreia também devem ser tidos em consideração durante a fluidoterapia (Macintire & Smith-Carr, 1997).

Após a rehidratação pode adicionar-se dextrose à fluidoterapia numa solução de 2,5% a 5% para controlar a hipoglicémia que surge como complicação de sépsis (Macintire & Smith-Carr, 1997; Sellon, 2005).

Os animais anoréxicos e com vômito e/ou diarreia são propensos a hipocalémia, o que resulta em fraqueza muscular, íleus, arritmia cardíaca e mal-estar geral. Se o valor de potássio estiver diminuído, deve adicionar-se cloreto de potássio aos fluidos endovenosos. Se o valor estiver dentro do intervalo normal, faz-se a administração de cloreto de potássio na dose de 14 a 20 mEq/L, para prevenir reduções futuras (DiBartola & Autran de Moraes, 1992; Macintire & Smith-Carr, 1997).

Alguns cachorros ficam extremamente anémicos como resultado da perda gastrointestinal de sangue devida ao parvovírus ou a parasitismo concomitante. A transfusão de sangue inteiro pode ser benéfica nestes animais. É seguro administrar uma dose de 10 a 20 ml/kg na maioria dos animais durante um período de 4 horas. Caso o animal não esteja anêmico mas apenas hipoproteinémico, deve optar-se por transfusão de plasma (10 a 20 ml/kg EV). Além de fornecerem componentes oncóticos, o sangue inteiro e o plasma contêm anticorpos e inibidores de protease séricos que podem auxiliar a neutralizar os vírus circulantes e a controlar a resposta inflamatória sistêmica que ocorre nesta afecção (McCaw & Hoskins, 2006; Macintire & Smith-Carr, 1997).

A destruição das vilosidades intestinais que ocorre na enterite por PVC-2 resulta em perda de proteína por enteropatia grave. Idealmente, a concentração de albumina sérica deve ser mantida nos 2,0g/dl ou em valores mais elevados (McCaw & Hoskins, 2006).

A administração de colóides é recomendada se a albumina descer abaixo de 1,5g/dl, as proteínas totais diminuírem abaixo de 3,5 g/dl ou se os animais desenvolverem edemas. Se ocorrer edema como resultado da hipoproteinémia e esta não for corrigida com transfusão de plasma, deve considerar-se o uso de colóides sintéticos como o hetastrach ou o dextran 70. Estes não devem ser administrados antes da correção da desidratação (McCaw & Hoskins, 2006; Macintire & Smith-Carr, 1997).

Para evitar sobrecarga de volume, os colóides não devem exceder a dose de 20ml/kg/dia, mas caso seja necessário podem repetir-se após 24 horas (Macintire & Smith-Carr, 1997). Os colóides também podem ser administrados rapidamente em animais em choque ou como infusão contínua durante 24 horas em animais mais estáveis. Regra geral, deve administrar-se um terço do volume necessário de colóide e os restantes dois terços de solução cristalóide (Macintire & Smith-Carr, 1997).

Geralmente, no tratamento da enterite por PVC são utilizados vários fármacos, nomeadamente antimicrobianos, agentes antieméticos e modificadores da motilidade. A administração de agentes antimicrobianos é recomendada devido à combinação da grave destruição do epitélio intestinal com a neutropénia periférica, o que aumenta o risco de sépsis. Por estas razões é indicada a administração parenteral de antibióticos bactericidas de largo espectro (McCaw & Hoskins, 2006; McCaw & Hoskins, 2006; Macintire & Smith-Carr, 1997; Pollack, 1993).

A combinação de um aminoglicosídeo (gentamicina ou ampicacina) com um β -lactâmico (ampicilina ou cefazolina) constitui uma excelente cobertura contra bactérias gram-negativas e anaeróbicas que podem provir do intestino (Weeran & Muir, 1992). Previamente à administração de uma substância nefrotóxica como os aminoglicosídeos, os pacientes devem estar devidamente hidratados para evitar o aparecimento de insuficiência renal aguda. Uma administração diária única destes antibióticos pode minimizar a lesão renal enquanto maximiza a morte bacteriana devida ao seu pico de concentração. Deve monitorizar-se o sedimento urinário, pois o aparecimento de cilindros e proteinúria indica lesão renal. Nesta situação deve descontinuar-se o uso de aminoglicosídeos (McCaw & Hoskins, 2006; Macintire & Smith-Carr, 1997).

A enrofloxacinina constitui uma boa alternativa aos aminoglicosídeos. Tem um excelente espectro contra gram-negativos mas não está aprovada para administração endovenosa e pode causar anomalias cartilagíneas em animais em crescimento (Macintire & Smith-Carr, 1997).

Os cães menos afectados e sem alterações no leucograma geralmente não necessitam de terapia antibiótica combinada. Nestes casos, as escolhas antimicrobianas adequadas incluem ampicilina, cefalosporinas de primeira geração ou trimetopim-sulfonamida (Macintire & Smith-Carr, 1997).

Uma vez que o vómito pode ser profuso, originar hipovolémia e alterações electrolíticas que colocam o animal em risco de vida, recorre-se a variadas substâncias para o controlo da emese. O vómito frequente pode gerar complicações como pneumonia por aspiração e erosão da mucosa esofágica e gástrica. Para além disto, exclui a possibilidade de administração de medicação *per os* e limita a nutrição, pelo que o controlo da emese constitui um importante componente do tratamento da enterite por PVC-2 (Mantione & Otto, 2005).

As substâncias antieméticas usualmente têm como alvo os neurotransmissores e os seus receptores, o que provoca a inibição central da emese, aumento da motilidade do tracto

gastrointestinal ou ambos. Os efeitos indesejados destas substâncias estão habitualmente relacionados com o seu mecanismo de acção. Os antieméticos de acção central podem provocar ansiedade, fasciculação muscular e sinais de sedação ou depressão. Os antagonistas dos receptores α adrenérgicos podem causar hipotensão, que é uma complicação grave no tratamento de animais hipovolémicos (Washabau & Elie, 1995; Mantione & Otto, 2005).

Os antieméticos mais comumente usados no tratamento da enterite por parvovírus são a metoclopramida e a clorpromazina. A metoclopramida é uma substância promotora da motilidade gástrica que reduz a emese através da estimulação do esvaziamento gástrico e da inibição da CTZ. O efeito pró-cinético pode prevenir ocorrência de atonia gástrica e íleus em cães. Caso esta substância não seja eficiente no controlo do vómito, a clorpromazina é um antiemético mais eficaz. É um derivado da fenotiazina e actua no centro do vómito, na CTZ e nos receptores periféricos. Os derivados fenotiazínicos podem causar hipotensão e vasodilatação sistémica devido ao seu efeito de bloqueio α -adrenérgico, pelo que só devem ser administrados em pacientes bem hidratados (Macintire & Smith-Carr, 1997).

Em casos de vómito incoercível, a metoclopramida e a clorpromazina podem ser utilizadas em simultâneo. É necessário ser-se particularmente cauteloso e vigilante, pois a probabilidade de ocorrência de potenciais efeitos secundários pode aumentar. Os animais devem ser atentamente observados de forma a reconhecer-se sinais como agitação, hiperactividade, comportamentos bizarros ou sonolência grave. Caso surja algum destes comportamentos a terapia antiemética deve ser descontinuada (Macintire & Smith-Carr, 1997).

O vómito incoercível pode responder ao tratamento com agentes antagonistas da serotonina como o ondansetron. Estas substâncias são muito eficazes e seguras, mas são também bastante dispendiosas (Cubeddu, Hoffman, Fuenmayor & Finn, 1990; Macintire & Smith-Carr, 1997).

O citrato de maropitant é um antagonista dos receptores de neuroquinina 1 que actua bloqueando a CTZ, o centro do vómito e os receptores periféricos e vestibulares. Foi a primeira substância a ser desenvolvida para o tratamento e prevenção do vómito em cães. É um anti-emético de largo espectro eficaz numa grande variedade de situações, tem acção rápida, é seguro e não muito dispendioso. Existe sob a forma injectável ou para administração oral. A sua segurança e eficácia no tratamento e prevenção do vómito agudo devido a várias etiologias foram avaliadas num estudo, que comprovou a sua capacidade de redução de episódios de emese (Ramsey *et al.*, 2008). A sua eficácia

foi comprovada na prevenção da emese em animais oncológicos em tratamento com cisplatina e em casos de vômito agudo associado a certas doenças como a gastroenterite a parvovírus, indiscrição alimentar e pancreatite (De la Puente-Redondo *et al.*, 2007b).

Num outro ensaio clínico realizado no ano de 2007 por De la Puente-Redondo, Tilt, Rowan e Clemence para avaliação da eficácia deste fármaco no tratamento e prevenção da emese devida a administração IV de cisplatina em cães, observou-se que os animais tratados com maropitant tiveram um menor número de episódios de emese e que o tempo médio para a cessação do vômito foi mais curto, em comparação com animais que receberam placebo. Constatou-se também que, no que diz respeito à prevenção da emese, no grupo de animais tratados houve menos episódios de vômito, comparando com o grupo placebo. Durante este estudo não foram registados efeitos adversos em nenhum dos grupos (De la Puente-Redondo, Tilt, Rowan & Clemence, 2007a).

No ano de 2008, Sedlacek, Ramsey, Boucher, Eagleson, Conder e Clemence realizaram um ensaio clínico com o intuito de comparar a eficácia do maropitant e outros fármacos na prevenção de emese induzida por emetogénios centrais ou periféricos em cães.

Os autores não registaram diferenças na eficácia do maropitant em relação à metoclopramida ou à clorpromazina na prevenção do vômito induzido centralmente por apomorfina, mas observaram que o ondansetron foi menos eficaz. No vômito induzido a nível periférico, a eficácia de maropitant e ondansetron foram semelhantes, sendo superior às da metoclopramida e da clorpromazina. Daqui se conclui que o maropitant é eficaz na prevenção de vômito por estimulação central e periférica. Também neste estudo não se registaram outros sinais clínicos à excepção da emese (Sedlacek *et al.*, 2008).

As substâncias anticolinérgicas não devem ser administradas a animais com enterite por PVC-2 uma vez que aumentam o potencial para atonia gástrica, íleus e invaginação de um segmento intestinal inflamado (Macintire & Smith-Carr, 1997).

A enterite por parvovírus constitui um factor de risco de invaginação intestinal e, apesar da influência da medicação antiemética não ter sido avaliada, as substâncias pró-cinéticas também podem elevar a probabilidade de ocorrer invaginação. Caso um animal desenvolva uma invaginação, o uso de substâncias pró-cinéticas é contra-indicado devido ao risco de ruptura intestinal (Mantione & Otto, 2005; Macintire & Smith-Carr, 1997).

A utilização de fármacos que alteram a motilidade raramente é recomendada. Contudo, se for necessária, é preferível o recurso a antiespasmódicos narcóticos como o

hidroclorato de difenoxilato ou o hidroclorato de loperamida (McCaw & Hoskins, 2006).

Num estudo retrospectivo realizado por Mantione e Otto no ano de 2005, a duração de hospitalização foi significativamente maior em cães com enterite por PVC-2 que receberam antieméticos comparativamente à dos que não receberam. Foi sugerida como explicação a necessidade dos animais que estão mais afectados receberem substâncias antieméticas. Além disto, é possível que efeitos não reconhecidos da administração de antieméticos como a hipotensão e sinais de depressão contribuam para períodos prolongados de internamento. Neste estudo recomenda-se a avaliação dos animais em relação a possuírem sinais de sépsis ou SRIS ou hipotensão previamente à administração de substâncias antieméticas (Mantione & Otto, 2005).

Durante a fase inicial da enterite por PVC-2 a terapia recomendada pode incluir a transfusão de plasma específico hiperimune ou de soro antiendotoxina. Foi defendido que esta abordagem reduz a mortalidade e a duração da hospitalização, porém é bastante onerosa (McCaw & Hoskins, 2006).

Está disponível para uso em animais de companhia um antisoro polivalente de origem equina contra as endotoxinas da LPS. As substâncias antiendotoxina são supostamente mais eficazes se administradas antes da terapia antimicrobiana, pois a concentração de LPS circulante aumenta de forma drástica após a antibioterapia. Os animais que recebam este soro devem ser observados durante a administração uma vez que podem ocorrer reacções anafiláticas. Se necessário, é possível repetir a administração deste soro 5 a 7 dias após o tratamento inicial (Macintire & Smith-Carr, 1997).

O uso de plasma hiperimune pode ser questionável pois na altura em que se manifestam os sinais clínicos, o nível de anticorpos está geralmente aumentado. No entanto, cachorros com uma resposta retardada ou mais fraca são frequentemente afectados de forma mais grave. O resultado do uso de IgG canina liofilizada é positivo no tratamento de cães com infecção natural por PVC-2. Quando comparado com cães controlo, os que receberam IgG como adjuvante do tratamento reduziram a gravidade da doença, o custo de tratamento e a duração da hospitalização. Os cachorros que sobrevivem nos primeiros 3 a 4 dias de enterite por PVC-2 geralmente têm uma recuperação rápida, normalmente dentro de uma semana em casos não complicados. Animais afectados de forma grave que desenvolvem sépsis secundária ou outra complicação, podem necessitar de períodos de hospitalização mais prolongados (McCaw & Hoskins, 2006).

O uso de factor estimulante de colónias de granulocíticas (G-CSF), uma citocina e factor de crescimento que potencialmente estimula a produção de neutrófilos e a sua libertação pela medula óssea, tem sido sugerido para o tratamento de neutropénias induzidas por parvovírus (Duffy, Dow, Ogilvie, Rao & Hackett, 2009).

Porém, dois estudos vieram demonstrar que o uso de factor estimulante de colónias granulocíticas recombinante humano (rhG-CSF) em cães com enterite por PVC-2 não é eficaz na estimulação da recuperação dos neutrófilos. O tratamento com rhG-CSF em cachorros com neutropénia induzida por parvovírus não melhorou a contagem de neutrófilos nem encurtou a duração de hospitalização, comparando com animais controlo (Rewerts, McCaw, Cohn, Wagner-Mann & Harrington, 1998). Um segundo estudo realizado em 2001 chegou a conclusões semelhantes e também não se registaram diferenças significativas relativamente à taxa de sobrevivência ou à contagem de neutrófilos em cachorros tratados com rhG-CSF quando comparando com o grupo controlo (Mischke, Barth, Wohlsein, Rohn & Nolte, 2001).

Assim, os trabalhos anteriormente publicados indicam que o tratamento com rhG-CSF de cães com neutropénia causada por parvovírus não é eficaz. Para além disto, o uso desta substância pode levar à rápida formação de Ac neutralizantes contra rhG-CSF, os quais podem também neutralizar cG-CSF endógeno (Duffy *et al.*, 2009).

A falta de eficácia de G-CSF exógeno deve-se possivelmente aos elevados níveis de G-CSF endógeno que estimulam ao máximo a produção de neutrófilos. Adicionalmente a todos estes factores, é um tratamento que atinge valores monetários proibitivos (Macintire & Smith-Carr, 1997; McCaw & Hoskins, 2006).

Um ensaio clínico de 2009 realizado por Duffy, Dow, Ogilvie, Rao e Hackett, no qual foi usado o factor recombinante canino de estimulação de colónias de granulócitos (rcG-CSF), foram observadas melhorias hematológicas significativas, com aumento do número de neutrófilos e leucócitos. Este tratamento também foi associado a uma redução do período de hospitalização. Apesar dos efeitos positivos, os autores concluíram que o tempo de sobrevivência dos cães tratados com rcG-CSF foi inferior ao dos animais controlo, inferindo alguma contribuição dos tratamentos diários no aumento do número de mortes.

O recurso a glucocorticóides e a flunixinina meglumina pode ser benéfico na fase inicial de sépsis ou endotoxémia. Estas substâncias não devem ser usadas até que a hidratação esteja corrigida e a sua administração não deve ser repetida para não aumentar a possibilidade de ocorrência de efeitos indesejáveis. Os potenciais efeitos benéficos dos

corticosteróides incluem a melhoria de perfusão dos tecidos, redução da marginação dos leucócitos, estabilização de membranas e redução da absorção de endotoxinas. A flunixinina meglumina é um potente anti-inflamatório não-esteróide com propriedades antidiarreicas e antipiréticas e que pode reduzir a gravidade da inflamação intestinal associada à infecção por PVC-2 (Macintire & Smith-Carr, 1997; McCaw & Hoskins, 2006).

Ambas as substâncias podem causar ulceração gastrointestinal grave. Por esta razão o uso destes agentes reserva-se para animais que exibam sinais iniciais de sépsis ou endotoxemia. Estas substâncias não devem ser dadas antes da administração do primeiro bolus de fluidos (Macintire & Smith-Carr, 1997).

Os animais infectados com PVC-2 podem necessitar de um período de hospitalização prolongado e de suporte nutricional para prevenir o catabolismo e o aparecimento de disfunções imunitárias relacionadas com o balanço negativo de nitrogénio. Apesar do jejum de sólidos e líquidos ser uma recomendação geral na abordagem a alterações do tracto GI, incluindo a enterite por parvovírus, as indicações recentes sugerem que tal não é necessário. Quando os animais com enterite por parvovírus são alimentados logo ao primeiro dia através de um tubo nasoesofágico, o seu tempo de recuperação é encurtado e há manutenção do peso corporal, comparando com animais que foram tratados da forma convencional de NPO (nada *per os*) até às 12 horas após o desaparecimento de sinais clínicos (Macintire & Smith-Carr, 1997; McCaw & Hoskins, 2006).

A nutrição entérica precoce é importante na promoção da regeneração intestinal. Inicialmente pode ser oferecida uma dieta líquida ou uma papa de componentes facilmente digeríveis, rica em hidratos de carbono e pobre em lípidos. As refeições iniciais devem ser pequenas, brandas e altamente digeríveis, mas dadas com grande frequência. A dieta regular é gradualmente reintroduzida após o apetite e as fezes terem regressado ao habitual (Macintire & Smith-Carr, 1997; Sellon, 2005).

Após a diminuição dos sinais clínicos do tracto GI, deve ser administrado desparasitante de largo espectro e tratamento para infecção por *Giardia*, uma vez que a presença de parasitas intestinais aumenta o *turn-over* celular dos enterócitos e consequentemente a replicação viral (Brunner & Swango, 1985; McCaw & Hoskins, 2006).

1.2.8 Prevenção e Medidas Profiláticas

O parvovírus é um dos vírus mais resistentes que infecta os cães. Pode perdurar durante meses a anos se não for exposto a luz solar ou a desinfectantes. Geralmente, quando um animal está infectado, a pelagem e o ambiente estão contaminados (McCaw & Hoskins, 2006).

Em caso de suspeita de infecção por PVC-2 é necessário proceder ao isolamento do animal. É recomendado a todos os indivíduos que contactem com o animal o uso de vestuário protector impermeável e de calçado de protecção que possa ser desinfectado ou eliminado. Após a manipulação dos animais ou de material infectado, deve proceder-se à lavagem minuciosa das mãos, de forma a minimizar a difusão do vírus. Deve aplicar-se lixívia comercial (hipoclorito de sódio) diluída em água (1:30) nas superfícies que a tolerem ou utilizar-se como banho para os animais que abandonam as instalações. Deve adicionar-se lixívia na lavagem de todos os utensílios e camas. Esta solução requer uma exposição minuciosa com a duração mínima de 10 minutos. A maioria dos detergentes e desinfectantes não inactivam o vírus, mas este é eficaz e economicamente acessível. A limpeza com vapor de água constitui uma alternativa eficaz para superfícies que não tolerem a lixívia (Tennant, 2001; McCaw & Hoskins, 2006).

Não existem relatos de infecções por PVC-2 em humanos, mesmo em profissões de alta exposição a ambientes profundamente contaminados, apesar de as pessoas poderem aparentemente funcionar como veículo de transporte passivo do vírus entre cães. Apesar de o PVC-2 não ser um agente patogénico para os humanos, devem ser tomadas precauções extra na manipulação de fezes diarreicas de animais (McCaw & Hoskins, 2006).

A vacinação é o único meio realístico e eficaz de prevenção e controlo desta doença. É um vírus ubiqüitário e, sendo estável no meio ambiente e facilmente transmitido por fomites, a prevenção da exposição é praticamente impossível (Sellon, 2005).

Nas primeiras semanas de vida os Ac maternos protegem os cachorros de infecção, mas podem também interferir com a imunização activa. À medida que o nível de Ac maternos declina, existe um período de duas a quatro semanas durante o qual o título é suficientemente elevado para que os cachorros sejam refractários à vacinação mas que é demasiado reduzido para que haja protecção, deixando os animais susceptíveis a

infecção. É provável que a grande maioria das falhas vacinais em cachorros resultem de exposição ao vírus durante este período susceptível crítico (Sellon, 2005).

As causas primárias de falha da vacinação de PVC são a interferência causada pelo título de Ac maternos e a insuficiente seroconversão da vacina administrada. A idade a partir da qual os cachorros podem ser imunizados com sucesso é proporcional ao título de Ac da mãe, à eficácia da transferência de Ac no colostro nas primeiras 24 horas e à imunogenicidade e título de antígeno da vacina de PVC-2. Os cachorros com mães que possuam títulos baixos de Ac contra PVC são imunizáveis às 6 semanas de idade, mas em cachorros com mães cujos títulos de Ac contra PVC-2 sejam muito elevados, os Ac maternos podem persistir durante mais tempo (Sellon, 2005; McCaw & Hoskins, 2006). Aproximadamente 25% dos cachorros são passíveis de ser imunizados às 6 semanas de idade, 40% às 9 semanas, 60% às 13 semanas, 80% às 16 semanas e mais de 95% às 18 semanas de idade (Sellon, 2005).

As vacinas disponíveis actualmente contra o PVC são seguras e eficazes. Estão disponíveis comercialmente vacinas vivas atenuadas e vacinas inactivadas contra o PVC-2. Estas vacinas desencadeiam níveis variáveis de imunidade protectora e são seguras, individualmente ou em combinações com outros componentes vacinais. As vacinas atenuadas de origem canina com título elevado e baixo número de passagens são actualmente as vacinas de eleição (Sellon, 2005; McCaw & Hoskins, 2006; Smith-Carr *et al.*, 1997).

Tanto as vacinas vivas atenuadas como as vacinas inactivadas para o PVC-2 são capazes de imunizar cachorros de forma eficiente. No entanto, as vacinas inactivadas fornecem uma reduzida imunidade contra a infecção. Apesar de os animais ficarem protegidos durante vários meses contra a doença (cerca de 15 meses se forem administradas doses seguidas), podem fazer infecções subclínicas (Pratelli *et al.*, 2001; McCaw & Hoskins, 2006).

Em contraste, as vacinas vivas atenuadas demonstraram proteger os animais pelo menos durante 2 a 3 anos. Não é necessário o reforço vacinal com maior frequência que anualmente. Os cães que recuperam de infecção por PVC-2 aparentam ter imunidade para o resto da vida (Pratelli *et al.*, 2001; Sellon, 2005; McCaw & Hoskins, 2006).

Os acontecimentos que sucedem à administração de vacinas vivas atenuadas contra o PVC-2 espelham os que se seguem à infecção por estirpes de campo. Ao segundo dia após a administração subcutânea da vacina, ocorre virémia e distribuição sistêmica, com eliminação viral através do tracto GI entre os dias 3 e 10. A diferença entre a infecção natural e a vacinal é a quantidade de vírus eliminada, a qual é mais reduzida após a vacinação. A resposta humoral às vacinas vivas atenuadas é semelhante à que ocorre na infecção natural (McCaw & Hoskins, 2006).

Cerca de 4 a 6 dias após a administração de algumas vacinas vivas atenuadas ocorre uma linfopénia passageira. Esta surge durante o início da resposta imunitária activa e não é devida a imunossupressão pelo vírus vacinal (Sellon, 2005; McCaw & Hoskins, 2006).

Apesar de existirem algumas preocupações acerca da possibilidade de reversão de virulência de algumas vacinas vivas e consequente aparecimento de doença, os resultados obtidos em estudos controlados indicam que as vacinas vivas modificadas são seguras. Nunca foi documentada a ocorrência de doença induzida por vacinas, tanto em casos naturais como experimentais (Sellon, 2005; McCaw & Hoskins, 2006).

Sem se conhecer o nível de Ac de cada ninhada, é difícil a recomendação de um calendário de vacinação prático que se traduza na imunização de todos os cachorros. Existe o problema adicional de os cachorros se tornarem susceptíveis à infecção por PVC-2 duas a três semanas antes de se poderem imunizar. Não existem vacinas capazes de eliminar por completo esta “janela” de susceptibilidade (Sellon, 2005).

De forma a maximizar a probabilidade de imunizar um cachorro, é recomendado que animais cujo estado imunitário é desconhecido sejam vacinados às 6, 9 e 12 semanas de idade, seguindo-se revacinação anual (Sellon, 2005; McCaw & Hoskins, 2006).

Pode fazer-se uma pesquisa do nível de Ac ou administrar-se uma dose extra de vacina às 15-16 semanas de idade, especialmente em raças que têm risco elevado de desenvolver enterite por PVC-2 (McCaw & Hoskins, 2006).

É sabido que alguns cães com título elevado de Ac de origem materna podem não ser imunizados por vacinas até às 18 semanas de idade. Em casos particulares pode ser aconselhável a administração de uma dose de vacina aos seis meses de idade. Independente do calendário utilizado, existe sempre o risco de exposição e desenvolvimento de doença durante a mencionada “janela” de susceptibilidade (Sellon, 2005).

A existência de níveis baixos de Ac maternos não impede uma resposta eficaz às vacinas potenciadas que estão presentemente disponíveis, as quais são têm maior capacidade de imunização que as vacinas originais convencionais de PVC. Estas vacinas não conferem protecção na presença de níveis de Ac de origem materna que interfiram com os antígenos vacinais e esses Ac podem persistir até às 16-18 semanas de idade em alguns cachorros (Sellon, 2005; McCaw & Hoskins, 2006).

Desconhece-se a protecção induzida pela estirpe original contra a estirpe PVC-2c após um longo intervalo entre a vacinação e o contacto com esta estirpe. É possível que nesta altura os Ac para o tipo 2 não sejam suficientes para prevenir a infecção e a doença causada pela estirpe 2c. Existe alguma preocupação que as diferenças antigénicas entre a estirpe 2 original e as suas variantes possam reduzir a eficácia das vacinas baseadas na estirpe 2 original. Assim, seria útil a preparação de vacinas recorrendo às estirpes que circulam em campo, tendo em conta que o PVC-2c tem sido frequentemente associado a doença em cães adultos (Pratelli *et al.*, 2001; Decaro *et al.*, 2008a; Decaro *et al.*, 2009b).

Apesar de não estarem actualmente disponíveis a nível comercial, existem vacinas vivas modificadas derivadas de PVC-2b. Estas geraram títulos de Ac para PVC-2b e PVC-2 mais elevados que a vacina derivada de PVC-2. Adicionalmente, a vacina de PVC-2b foi capaz de produzir um aumento no título em cachorros com níveis de Ac maternos elevados (McCaw & Hoskins, 2006).

1.3 Cinética Leucocitária

O hemograma é um teste de rastreio essencial para avaliar o estado hematológico. Fornece informação qualitativa e quantitativa sobre os eritrócitos, leucócitos e trombócitos. O leucograma é composto pelas contagens total, diferencial relativa e absoluta de leucócitos e pela avaliação da morfologia leucocitária. A avaliação do leucograma permite inferir as respostas fisiológicas e patológicas dos leucócitos a variados estímulos, gravidade de doença, resposta ao tratamento e prognóstico (Jain, 1986; Latimer & Rakich, 1989; Jain, 1993; Latimer & Prasse, 1994; Latimer, 1995; Schultze, 2000).

A interpretação correcta do leucograma baseia-se na contagem de leucócitos em número absoluto (percentagem de tipo de leucócito x contagem total de leucócitos) e não na percentagem relativa. A contagem absoluta reflecte o número total de cada tipo celular dentro da população leucocitária geral. Os valores de vários tipos de leucócitos podem alterar-se simultaneamente e o padrão de resposta é importante na consideração da lista de diagnósticos diferenciais. Pode ser necessária a realização seriada de leucogramas e mielogramas durante dias ou semanas para avaliar com precisão os padrões de resposta em certas doenças (Latimer & Prasse, 1994; Schultze, 2000).

A contagem total de leucócitos em cães saudáveis varia entre 6.000 a 17.000 células/ μ L de sangue. Os leucócitos presentes no sangue de cães incluem neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. O neutrófilo é o tipo de leucócito mais frequente, seguido do linfócito. Os monócitos e os eosinófilos são observados menos frequentemente e os basófilos são raros (Latimer & Prasse, 1994).

As alterações na contagem total de leucócitos são causadas principalmente por variações no número de linfócitos e neutrófilos. Os números de ambos os tipos celulares vão diminuindo com a idade. Os eosinófilos também decrescem, mas o seu efeito é mínimo na contagem total de leucócitos. A contagem de monócitos tende a aumentar ligeiramente ao longo da vida (Jain, 1986; Latimer & Prasse, 1994; Schultze, 2000).

Medula Óssea

A expressão completa de todas as linhas celulares maduras está confinada à medula óssea. As linhas eritróide e mielóide e os megacariócitos existentes na medula óssea

dividem-se em compartimentos proliferativo e de maturação (Valli & Jacobs, 2000; Van Furth *et al.*, 1972).

O rácio mielóide:eritróide (M:E) da medula canina situa-se entre 1,0:1 e 2,0:1. Num estudo de 1970 realizado por Penny e Carlisle, foi observado que os machos normais possuíam um ratio M:E significativamente superior ao das fêmeas, atingindo proporções de 2,9:1.

A comparação de amostras de medula óssea recolhidas de várias localizações anatómicas revelou que as percentagens dos vários elementos celulares são bastante uniformes. Também se concluiu que a recolha repetida de amostras medulares a partir da mesma localização tem pouco efeito na contagem celular diferencial (Penny & Carlisle, 1970; Rekers & Coulter, 1948; Jain, 1993; Mitema, 1985).

Em comparação com animais mais velhos, os neonatos possuem uma percentagem significativamente maior de linfócitos nas amostras de medula óssea. Meinkoth e Clinkenbeard observaram que a percentagem de linfócitos atinge um pico aos 21 dias de idade, alcançando os 54,7%. Este valor vai posteriormente reduzir, sendo 17,6% ao dia 56. Nos cães mais velhos a quantidade de linfócitos presente nas amostras de medula óssea é geralmente de 10% (Earl, Melveger & Wilson, 1973; Meinkoth & Clinkenbeard, 1986).

Sempre que ocorre uma inflamação com alguma dimensão em alguma parte do organismo, existe expansão do pool medular granulocítico e hiperplasia granulocítica. As características da resposta leucocitária diferem com o tipo, duração e gravidade da inflamação. A mudança inicial é a depleção do compartimento de armazenamento de granulócitos maduros, associada geralmente a neutrofilia. Se surgirem formas imaturas de neutrófilos no sangue periférico como resposta à inflamação, vão existir granulócitos imaturos em número aumentado na medula óssea (Jain, 1986).

A infecção por PVC-2 resulta numa depleção marcada de granulócitos da medula óssea, sugerindo que os precursores dos linfócitos constituem um dos alvos do vírus. A medula óssea pode apresentar níveis variáveis de pan-hipoplasia, sendo possível observar-se áreas de necrose multifocais, células hemáticas degeneradas e aumento dos macrófagos fagocíticos (Potgieter *et al.*, 1981).

Cerca de 10 a 14 dias após o fim da lesão medular, ocorre hiperplasia dos elementos granulócitos e eritróides da medula óssea num aparente esforço de restituir células perdidas durante a fase aguda da doença. As células estaminais repovoam a medula

óssea com células progenitoras, com consequente resolução das citopénias sanguíneas existentes. Podem observar-se alterações displásicas nas linhas celulares eritróide, mielóide ou megacariocítica durante a fase de convalescença. A recuperação ocorre num período de 21 dias (Weiss, 2000).

Anemia aplásica

A anemia aplásica, também denominada pancitopénia aplásica, caracteriza-se pela presença de pancitopénia sanguínea e pan-hipoplasia da medula óssea, com substituição do espaço medular por tecido adiposo (Tveden, 1994; Weiss, 1984).

Independentemente da causa, a anemia aplásica pode ser aguda ou crónica. A aguda está frequentemente associada à destruição de células progenitoras ou proliferativas (Weiss, 1990; Weiss, 2000).

Os sinais clínicos associados a leucopénia e trombocitopénia surgem geralmente 2 semanas após a lesão medular inicial. A neutropénia desenvolve-se 5 a 6 dias após ocorrerem alterações na medula óssea, seguida de trombocitopénia, a qual surge nos 8 a 10 dias seguintes. Na forma aguda, a anemia é ligeira ou está ausente pois os eritrócitos possuem um longo período de semi-vida (Weiss, 2000).

A destruição das células medulares estaminais ou progenitoras é frequentemente causada por agentes infecciosos, fármacos ou toxinas. A infecção por parvovírus causa anemia aplásica aguda possivelmente como consequência da replicação viral em células progenitoras e proliferativas. No entanto, não se pode eliminar a possibilidade de existência de lesão medular originada por septicémia ou por endotoxínemia secundária. Na infecção por PVC-2 a medula óssea apresenta alterações graves dos componentes hemáticos, necrose e aumento dos macrófagos fagocíticos. A recuperação hematológica geralmente é rápida se o animal sobreviver à fase aguda da doença (Bossinger *et al.*, 1982; Weiss, 2000).

Neutrófilos e Neutropénia

Os neutrófilos constituem a linha de defesa primária contra microorganismos. A sua função primordial é a ingestão e eliminação de bactérias, sendo também capazes de lesionar ou destruir fungos, leveduras, algas, parasitas e vírus. Adicionalmente, os neutrófilos podem induzir citotoxicidade dependente de Ac destruindo células alteradas,

modulam reacções inflamatórias agudas através da secreção de pirógenos endógenos e controlam a granulopoiese (Diamond, Krzesicki, Epstein & Wellington, 1978; House, Babiuk & Henson, 1980; Williams & Bunch, 1981; Smith & Lumsden, 1983; Babiuk, Hurk & Tikoo, 1996).

Em condições normais, os neutrófilos são libertados pela medula óssea como células maduras, as quais, após um breve período em circulação, migram através do endotélio vascular para os tecidos. Têm origem conjunta com os monócitos a partir de células progenitoras bipotenciais (Smith, 2000).

No cão, o tempo de semi-vida dos neutrófilos em circulação varia entre as 5,5 e as 7,6 horas. Após a migração aleatória (não ordenada por idade) para os tecidos, podem aí subsistir durante 1 a 4 dias adicionais, sendo depois fagocitados pelo sistema mononuclear fagocítico (SMF) ou eliminados através das superfícies das mucosas. Quando são recrutados para locais de inflamação e após terminada a sua função, os neutrófilos morrem por apoptose (Deubeleiss, Dancey, Harker & Finch, 1975; Kim & Demetri, 1996; Smith, 2000).

Os leucogramas de cães saudáveis apresentam dois tipos de neutrófilos, os segmentados e os que ainda não sofreram segmentação. Os neutrófilos não segmentados têm dimensões e aspecto semelhante aos neutrófilos maduros multilobulados, mas distinguem-se por possuírem um núcleo não segmentado, de contornos lisos e com extremidades aparentemente paralelas. A cromatina é geralmente menos condensada (Smith, 2000).

Os neutrófilos existentes na medula óssea podem ser divididos em dois compartimentos. O pool proliferativo (mitótico) contém cerca de 20% dos neutrófilos totais, os quais são capazes de divisão celular. Aproximadamente 70% dos neutrófilos (metamielócitos, neutrófilos segmentados e não segmentados) compõem o pool de maturação e reserva. Estas células são funcionalmente maduras mas não são capazes de replicação. Os restantes 10% encontram-se no sangue periférico (Smith, 2000; Brown & Rogers, 2001; Griwden, 1989; Latimer & Prasse, 1994).

A permanência em cada compartimento é aproximadamente 2 a 3 dias. Este período pode ser encurtado se ocorrer a libertação precoce de formas imaturas de neutrófilos para responder a necessidades por partes dos tecidos. A libertação das células pela medula óssea faz-se de acordo com a sua idade, sendo as células mais maduras libertadas em primeiro lugar (neutrófilos segmentados e não segmentados). Os cães

possuem uma reserva celular equivalente a 5 dias, a uma taxa de depleção normal (Deubeleiss *et al.*, 1975; Latimer & Prasse, 1994; Smith, 2000).

Se a necessidade tissular de neutrófilos se intensificar, as células maduras vão-se esgotando, sendo então enviadas para a circulação formas mais imaturas (neutrófilos não segmentados), o que é denominado desvio à esquerda. Quando este desvio é acompanhado por um aumento de neutrófilos maduros designa-se por desvio à esquerda regenerativo. Denomina-se desvio à esquerda degenerativo quando ocorre desvio à esquerda em simultâneo com uma contagem de neutrófilos maduros normal ou diminuída (Latimer & Rakich, 1989; Kociba, 2000).

Os neutrófilos presentes no sangue distribuem-se de forma alternada por dois pools, designados por pool de neutrófilos marginal (PNM) e pool de neutrófilos circulante (PNC). Este último é constituído pelos neutrófilos que se deslocam dentro dos vasos sanguíneos, e que constituem parte das amostras recolhidas por venipunctura para avaliação dos leucócitos. Os neutrófilos que aderem de forma intermitente ao endotélio vascular compõem o PNM, e não estão incluídos nas contagens leucocitárias de rotina. O conjunto de PNM e de PNC constitui o pool total de neutrófilos sanguíneos. No cão, o número de granulócitos no PNM é aproximado ao do PNC (Smith, 2000).

Em animais saudáveis, os neutrófilos movem-se de forma aleatória e unidireccional do sangue para os tecidos, com uma permanência no sangue de cerca de 10 horas (Smith, 2000).

O número de neutrófilos no sangue depende de vários factores, incluindo a taxa de libertação da medula óssea, a sua distribuição pelos pools marginal e circulante, a sua migração do sangue para os tecidos e o sequestro de neutrófilos pelos tecidos (Jain, 1986; Latimer & Rakich, 1989).

Uma contagem de neutrófilos em números absolutos que seja inferior ao intervalo de referência da espécie, género e idade é denominada de neutropénia. É uma alteração menos comum que a neutrofilia. Como os neutrófilos são a linha de defesa primária contra microorganismos, uma neutropénia prolongada traduz-se por um risco de infecção aumentado. Para a prevenção de infecções é necessário um *turn-over* e fornecimento contínuo de neutrófilos aos tecidos. Dado que a medula óssea possui uma grande capacidade de reserva, apenas as lesões medulares generalizadas e graves causam neutropénia (Smith, 2000; Schultze, 2000).

Os mecanismos mais comuns de neutropénia são a diminuição da produção medular de neutrófilos ou a sua produção ineficiente, a migração do pool circulante para o marginal e a excessiva migração destas células para os tecidos, ultrapassando a sua libertação medular (Jain, 1986; Latimer, 1995).

A produção ineficaz ou reduzida é causada por doenças que inibem o desenvolvimento de neutrófilos a nível medular. Na maioria dos casos a medula óssea encontra-se hipoproliferativa, devido ao tecido medular ser substituído por tecido fibroso ou adiposo, ficando poucos precursores hemopoiéticos nos pools proliferativo e de reserva. O resultado final em ambas as situações é a libertação de uma quantidade reduzida de neutrófilos maduros (Moore & Bender, 2000).

A neutropénia causada por migração excessiva de neutrófilos para os tecidos constitui uma situação transitória. Esta ocorre nas horas a dias que se seguem a um intenso estímulo inflamatório, que causa depleção do pool de reserva medular. O número de neutrófilos no PNC é o reflexo do equilíbrio entre os que entram no sangue provindos da medula óssea e os que saem para os tecidos. As doenças que originam neutropénia por este mecanismo são geralmente infeções agudas por bactérias gram-negativas que envolvem extensas áreas corporais (Moore & Bender, 2000).

A endotoxina libertada pela parede de algumas bactérias gram-negativas causa migração de neutrófilos do pool circulante para o marginal. A consequente neutropénia é causada pela presença de sequestro a par com uma excessiva necessidade de neutrófilos dos tecidos devida à presença de microorganismos (Moore & Bender, 2000; Brown & Rogers, 2001).

Uma vez que os neutrófilos são os leucócitos circulantes predominantes nos animais de companhia, a neutropénia causa quase sempre leucopénia. A neutropénia e a leucopénia que ocorrem na enterite por parvovírus canino podem ser atribuídas a diversos mecanismos (Brown & Rogers, 2001).

A neutropénia que se instala é mais grave entre os 5 e os 8 dias após a infeção viral e pode acompanhar-se de desvio à esquerda. Existem outros mecanismos que podem contribuir para a neutropénia na parvovirose canina, como a depleção de neutrófilos medulares devido à exigência excessiva tecidual ou o desvio de neutrófilos circulantes para o pool marginal devido à endotoxínemia secundária e granulopoiese ineficaz (Smith, 2000).

A endotoxínemia e a necrose gastrointestinal causam depleção do pool de maturação e de armazenamento medular. A endotoxínemia pode ainda despoletar um aumento da

marginação dos neutrófilos nos vasos sanguíneos. A produção ineficaz de neutrófilos pode também aumentar (Latimer, 1995; O'Donnell & Andersen, 1982; Fittschen, Parmley & Austin, 1988).

Em neutropénias por inflamação grave, a taxa de migração de neutrófilos para os tecidos excede a capacidade de produção da medula óssea, apesar do seu aumento e da sua maior libertação medular. A inflamação pode resultar de várias causas, incluindo infecções bacterianas ou fúngicas primárias ou secundárias, endotoxínemia, necrose tissular e alterações imuno-mediadas. Os desvios à esquerda e as alterações tóxicas são comuns (Latimer & Rakich, 1989; Smith, 2000).

Pode surgir um conjunto de alterações tóxicas nos neutrófilos induzidas por doenças. A vacuolização e basofilia do citoplasma, a presença de corpos de Döhle ou a existência de grânulos marcados de forma proeminente são consideradas alterações tóxicas. Estas lesões citoplasmáticas podem ser observadas em casos de infecção grave, tanto localizada como sistémica, inflamação estéril e toxicidade induzida por substâncias químicas (Latimer & Prasse, 1994; Jain, 1993; Jain, 1986; Latimer, 1995; Barsanti & Finco, 1984; Hirsh, Jang & Biberstein, 1984; Salisbury, Lantz, Nelson & Kazacos, 1988; Gossett, MacWilliams, Enright & Cleghorn, 1983).

A observação destas alterações tóxicas confere um prognóstico reservado, porque indiciam um comprometimento da produção assim como da função de neutrófilos. Na septicémia é possível detectar bastonetes, cocos bacterianos ou outros agentes de fagocitose no citoplasma de neutrófilos (Schultze, 2000).

Eosinófilos e Eosinopénia

Os eosinófilos desenvolvem-se na medula óssea e, em menor quantidade, no timo, baço e LN. Estes leucócitos diferenciam-se e maturam na medula óssea durante um período de 2 a 6 dias, dependendo da espécie (Hudson, 1968; Young, 2000).

Em cães saudáveis, o tempo de semi-vida dos eosinófilos em circulação é inferior a uma hora e a sua migração para os tecidos é aleatória, podendo reentrar na circulação em condições patológicas (Dale, Hubert & Fauci, 1976; Jain, 1986; Wardlaw & Kay, 1995). Os eosinófilos são células que permanecem nos tecidos, com localização no tecido conjuntivo de órgãos que facilmente podem constituir a porta de entrada a substâncias estranhas, como a pele e os tractos respiratório e gastrointestinal (Young, 2000).

São leucócitos de dimensões superiores às dos neutrófilos e têm um núcleo bi ou trilobado com cromatina condensada e citoplasma abundante, o qual contém grânulos arredondados que podem variar consideravelmente em número e tamanho. Estes constituem a característica estrutural mais marcante. Em alguns cães, os eosinófilos aparecem desgranulados ou vacuolizados (Young, 2000).

As funções basílares destes leucócitos são a destruição de parasitas (principalmente helmintas) e a modulação de reacções de hipersensibilidade. Também promovem a inflamação, são componentes das doenças alérgicas, são capazes de fagocitar e têm efeito anti-tumoral. Apesar de realizarem fagocitose, não são tidos como eficazes na protecção contra a maioria das infecções bacterianas (Jain, 1986; Butterworth & David, 1981; Beeson, 1983; Young, 2000; Latimer & Prasse, 1994).

Participam ainda na imunidade mediada por células T, através do reconhecimento e apresentação de antígenos, e podem também contribuir para os processos de cicatrização, esclerose e fibrinólise (Capron *et al.*, 1989; Wardlaw & Kay, 1995; Young, 2000).

A contagem de eosinófilos num cão normal pode variar entre 0 a 1300 por microlitro. Uma vez que muitos animais têm contagens de zero células, é difícil documentar uma eosinopenia verdadeira. É uma alteração com valor clínico muito limitado. O número de eosinófilos em circulação é influenciado pelos níveis de cortisol, idade, exercício físico e exposição a estímulos ambientais.

A eosinopenia pode surgir em algumas infecções agudas e reacções inflamatórias. Apesar de não ser conhecido o mecanismo que desencadeia a eosinopenia, é possível que esta se deva à libertação de corticosteróides e catecolaminas. Outros investigadores sugerem o sequestro, desgranulação ou destruição de eosinófilos nas lesões inflamatórias como explicação da eosinopenia (Latimer & Prasse, 1994; Jain, 1986; Yamaguchi *et al.*, 1991; Young, 2000; Lee *et al.*, 1993).

A eosinopenia que ocorre na infecção por PVC-2 pode ser causada por uma combinação de mielossupressão, ausência de linfócitos T estimuladores da produção medular de eosinófilos e libertação de uma elevada concentração de cortisol (Smith, 2000; Latimer & Prasse, 1994; Young, 2000).

Basófilos

Os basófilos são raramente observados nos esfregaços sanguíneos. São ligeiramente maiores que os neutrófilos segmentados, correspondem a menos de 2% da contagem diferencial de leucócitos e variam na contagem absoluta entre 0 a 140 basófilos/ μ L. Têm um núcleo com uma lobulação discreta e o citoplasma contém grânulos metacromáticos arredondados e muito dispersos que variam amplamente em quantidade e dimensão. Estes grânulos contêm mediadores pré-formados, nomeadamente histamina e heparina. Quando estimulados, os basófilos sintetizam factores de estimulação plaquetária, tromboxano A₂ e leucotrienos C₄, D₄ e E₄. Estão intimamente envolvidos na defesa do organismo através de reacções mediadas pela gama imunoglobulina E (IgE) (Latimer & Prasse, 1994; Latimer, 1995; Jain, 1986; Halliwell & Schemmer, 1987).

Participam ainda em vários processos fisiológicos importantes, incluindo a estimulação e inibição da hemostase e a eliminação de certos parasitas como as carraças. É possível que também estejam envolvidos na citotoxicidade das células neoplásicas resultante da vigilância imunitária (Jasper & Jain, 1964; Dvorak & Dvorak, 1979; Newball, Meier & Lichtenstein, 1980; Anthony, 1982; May & Waddell, 1984; Huntley, 1992).

Linfócitos e Linfopénia

Os linfócitos caninos são células mononucleares redondas e pequenas. O seu núcleo tem uma forma redonda a oval e possui cromatina agregada e nucléolos indistintos. O citoplasma é escasso e pode conter grânulos azurofílicos. Em animais sãos, o linfócito é o segundo tipo de leucócito mais comum. Os linfócitos B compõem a imunidade humoral e os linfócitos T constituem parte da imunidade mediada por células. Estes dois tipos de linfócitos são semelhantes à observação microscópica. No entanto, a maioria dos linfócitos no sangue são linfócitos T. Os linfócitos B têm uma semi-vida curta (dias a semanas) quando comparando com os linfócitos T (meses a anos). Os linfócitos são singulares dentro dos leucócitos pela sua capacidade de recircular e de realizar mitose (Latimer & Prasse, 1994; Jain, 1986; Jain 1993).

As funções dos linfócitos podem ser divididas em produção de anticorpos, actividades reguladoras e citotoxicidade através da imunidade mediada por células (Latimer & Prasse, 1994).

A linfopénia corresponde a um valor inferior a 1000 linfócitos/ μ L de sangue, sendo frequente nos leucogramas de animais doentes e que pode resultar de diferentes mecanismos (Latimer & Prasse, 1994).

Nas infecções agudas a linfopénia pode ocorrer devido à libertação de corticosteróides secundária a stress e à redistribuição dos linfócitos. Quando ocorre redistribuição, algumas destas células podem ficar retidas nos LN, os quais podem estar aumentados de volume. Alguns vírus, com o PVC-2, causam destruição de linfócitos, atrofia de tecidos linfóides e depleção das subpopulações linfocitárias (Latimer & Prasse, 1994; Jain, 1986; Latimer, 1995; Jain, 1993; Young & Mortimer, 1984).

Na gastroenterite por parvovírus a linfopénia também pode ser atribuída a perda, sequestro ou bloqueio da circulação de linfa rica em linfócitos, à semelhança do que acontece na enteropatia com perda de proteína (Goddard, Leisewitz, Christopher, Duncan & Becker, 2008).

Os linfócitos podem sofrer alterações morfológicas. Os linfócitos reactivos (imunócitos e linfócitos transformados) são células linfóides estimuladas por antígenos que são observadas ocasionalmente no sangue de cães. Estas células linfóides são provavelmente linfócitos T, embora também possam ser linfócitos B. São ligeiramente maiores que os linfócitos normais e o seu citoplasma é altamente basofílico. O núcleo contém cromatina agregada e pode ter as margens rendilhadas. Os nucléolos são geralmente indistintos. O citoplasma pode ter uma zona de Golgi com localização perinuclear e pode conter poucos vacúolos (Latimer & Prasse, 1994; Latimer, 1995; Schultze, 2000).

Monócitos

Os monócitos e os macrófagos tissulares fazem parte do SMF, estando presentes em virtualmente todos os tecidos e cavidades do organismo.

Os monócitos são produzidos na medula óssea e descendem de células estaminais hematopoiéticas pluripotentes, tal como todas as outras células sanguíneas. A célula precursora bipotencial é comum a granulócitos maduros e a monócitos, porém o tempo de produção de monócitos (3 dias) é mais curto que dos neutrófilos (6 dias) (Latimer, 1995; Latimer & Prasse, 1994; Bienzle, 2000).

O número de monócitos sanguíneos é de 150 a 1350 por microlitro. Embora sejam células sanguíneas pouco numerosas, são as precursoras dos macrófagos, os quais são

essenciais à vida. Os monócitos circulam de forma passageira no sangue periférico e abandonam os vasos aleatoriamente ou nos locais de inflamação, não reentrando em circulação e, sob a influência de factores específicos dos tecidos, diferenciam-se em macrófagos (Bienzle, 2000).

Não existe um compartimento de armazenamento medular para estes leucócitos, daí que habitualmente não sejam observados em preparações de medula óssea de animais são (Bienzle, 2000).

Os monócitos são células de grandes dimensões com núcleo pleomórfico (redondo, oval, bilobado ou multilobado), cuja cromatina é fina. Têm dimensões semelhantes ou ligeiramente inferiores às dos neutrófilos, mas são maiores que os linfócitos. Os monócitos contêm grande quantidade de citoplasma que pode ter numerosos pequenos vacúolos e alguns grânulos (lisossomas). É possível observar pseudopodes projectados a partir da membrana citoplásmica. Os monócitos caninos possuem um citoplasma mais granular e o seu núcleo assemelha-se ao dos neutrófilos não segmentados (Latimer & Prasse, 1994; Bienzle, 2000).

Os monócitos e os macrófagos têm uma aparência distinta ao microscópio electrónico. A superfície do monócito é extensivamente ondulada, o que se relaciona com a motilidade da célula e com a capacidade fagocítica. O citoplasma contém vacúolos, pequenos grânulos heterogéneos, numerosas mitocôndrias, quantidade variável de ribossomas e um retículo endoplasmático discreto. A membrana citoplasmática dos macrófagos é semelhante, mas as características citoplasmáticas reflectem o grau de diferenciação e a actividade fagocítica da célula. Os lisossomas são numerosos e o aparelho de Golgi é bastante desenvolvido (Bienzle, 2000).

As funções destas células são muitas e diversas. Incluem a fagocitose e morte de agentes infecciosos, fagocitose e digestão de células alteradas, detritos celulares e outras partículas, a secreção de citoquinas, de mediadores químicos da inflamação e também de factores de estimulação de colónias necessários à hematopoiese, a remodelação de tecidos, a apresentação de antígenos a linfócitos e ainda a citotoxicidade dirigida a células estranhas ou tumorais através de reconhecimento imunitário e a vigilância de células tumorais ou infectadas por vírus. Os macrófagos são essenciais nas reacções inflamatórias, em respostas imunitárias e em processos metabólicos (Latimer & Prasse, 1994; Latimer, 1995; Bienzle, 2000)

Quando ocorre inflamação, a semi-vida dos monócitos sanguíneos é encurtada e aumenta a quantidade de células que deixa a circulação e regressa à medula óssea. Os monócitos acumulam-se no local de lesão em número inferior aos neutrófilos. A maioria dos monócitos que acorrem ao local de inflamação são recrutados a partir do sangue. Quando não há inflamação, os monócitos deixam a circulação de uma forma aparentemente fortuita (Bienzle, 2000).

A duração exacta dos macrófagos que existem nos tecidos não é conhecida, mas parece que os macrófagos residentes são duradouros, enquanto os monócitos e os macrófagos que respondem aos estímulos inflamatórios perduram por pouco tempo.

A monocitose, definida por valores que excedam os 1350 monócitos/ μ L de sangue, pode dever-se a múltiplas causas, podendo estar associada a doenças agudas ou crónicas. A ausência de produção de monócitos acompanha a falha hematopoiética completa que ocorre aquando da anemia aplásica e a leucopénia observada em muitas doenças mieloproliferativas. A monocitopénia é de importância diminuta comparada com neutropénia, a qual é potencialmente fatal (Latimer & Prasse, 1994; Bienzle, 2000). Contagens e morfologias anómalas de monócitos podem reflectir a cinética de neutrófilos. A recuperação do número de monócitos precede o reaparecimento de neutrófilos no sangue. Isto é especialmente perceptível na panleucopénia secundária a infecções por parvovírus, à toxicidade por estrogénios ou a quimioterapia. Nestas situações, a monocitopénia seguida de contagens normais de monócitos ou de monocitose anuncia a recuperação da produção de neutrófilos (Bienzle, 2000).

Apesar de haver poucas doenças específicas nos animais de companhia associadas a monocitopénia, a monitorização da contagem de monócitos pode ser benéfica na avaliação de animais com leucopénia ou com neutropénia. A monocitose ocorre em associação à neutrofilia e raramente surge como alteração única num leucograma (Bienzle, 2000; Latimer & Prasse, 1994; Latimer, 1995; Gaunt, Gaunt & Craig, 1983).

2 OBJECTIVOS

Caracterização do grupo de estudo em relação à mortalidade, idade, sexo, raça, estado vacinal, duração de hospitalização e sazonalidade da doença.

Caracterização do estímulo iatrotópico e principais queixas dos proprietários dos animais em estudo.

Estudo da evolução da contagem total média de leucócitos durante o período de hospitalização dos animais.

Estudo da evolução da contagem absoluta média de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos durante o período de internamento.

Investigação do comportamento dos parâmetros eritrocitários durante o internamento dos animais.

Investigação da variação da contagem plaquetária média durante a hospitalização.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho de estudo

Este estudo foi realizado na Clínica Veterinária AZEVET, sita em Brejos de Azeitão, no concelho de Setúbal. Foi construído a partir de informação retrospectiva, que foi recolhida a partir dos ficheiros clínicos de animais internados entre 25 de Julho de 2006 e 31 de Julho de 2009, e de casos prospectivos que decorreram entre 1 de Agosto de 2009 e 31 de Janeiro de 2010.

Os canídeos apresentados de forma livre à consulta foram considerados elegíveis para integrar o estudo, quando se verificavam os seguintes critérios de inclusão:

- Existência de história e sinais clínicos compatíveis com gastroenterite a parvovírus.
- Diagnóstico positivo para pesquisa de Ag fecais de Parvovírus obtido por teste rápido de ELISA (*Witness Parvo*[®] - *Synbiotic Corporation*).
- Ausência de vacinação com vacinas vivas atenuadas contra o PVC-2 nos 15 dias anteriores à apresentação.
- Consentimento por parte do proprietário em prosseguir com o internamento médico e correspondente terapêutica de suporte.
- Existência de pelo menos um hemograma realizado durante o período de internamento.

Foram incluídos no estudo 14 casos retrospectivos e 14 casos prospectivos de pacientes com gastroenterite por parvovírus.

3.2 Métodos complementares de diagnóstico

A todos os proprietários que se apresentaram à consulta com animais jovens sem vacinação ou com vacinação incompleta e com sinais de gastroenterite a parvovírus (diarreia, vômito, prostração e anorexia) foi sugerida a realização de um teste rápido de pesquisa de Ag fecais de PVC-2.

Após ser dado o consentimento, procedeu-se à realização do teste rápido de ELISA (teste *Witness*[®] *Parvo*, o qual detecta todas as estirpes de parvovírus). O teste foi sempre

realizado por Médicos Veterinários ou por estudantes estagiários de Medicina Veterinária sob a sua supervisão.

Este teste baseia-se na tecnologia de imunomigração rápida (IMR), que detecta a presença do antígeno de PVC-2 nas fezes de cão. Partículas sensibilizadas ligam-se ao antígeno do PVC-2 presente na amostra (extracto de fezes) e migram ao longo de uma tira de nitrocelulose. Este complexo é então capturado numa zona reactiva, sensibilizada, onde a sua acumulação forma uma banda púrpura, claramente visível. Uma outra banda púrpura na janela de controlo assegura que o teste foi realizado correctamente, validando o resultado.

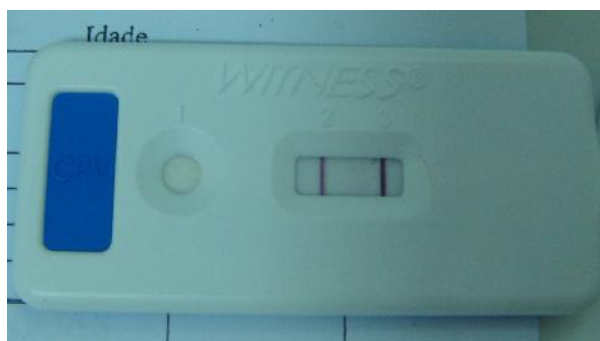
Para se proceder à colheita da amostra fecal, retirou-se a parte superior, que contém a zaragatoa de algodão, de uma pipeta de colheita da amostra. Em seguida a solução tampão foi depositada na base da pipeta de colheita da amostra, até que a solução atingisse a marca graduada. Depois de retirada a parte superior da pipeta de colheita, esta foi utilizada como zaragatoa rectal para recolha de uma amostra de fezes frescas ou como zaragatoa em amostra de fezes recolhidas. Esta zaragatoa é novamente colocada no interior da pipeta e mergulhada na solução tampão depositada na sua base. Uma vez fixada de forma segura a parte superior à base da pipeta, agita-se suavemente durante 5 segundos de modo a assegurar a boa extracção da amostra.

Após retirada da saqueta, depositou-se a amostra numa placa teste colocada numa superfície horizontal, durante a execução do teste. Seguidamente quebra-se a ponta da pipeta contendo o extracto da amostra de fezes e inverte-se a pipeta, segurando-a em posição vertical. Aperta-se suavemente a base, por forma a depositar cinco gotas da amostra na cúpula da amostra (janela (1) da placa teste). Caso não haja migração ao nível da janela (2), após 1 minuto, junta-se uma gota adicional de amostra.

A leitura do teste foi realizada após 10 minutos. Deve verificar-se a presença ou ausência de bandas de cor púrpura nas janelas (2) e (3). Os resultados da amostra são lidos na janela (2), a banda de controlo é lida na janela (3).

O teste é válido se houver uma banda púrpura na janela (3). Caso tal não se observe, o teste não é válido e deve ser repetido.

Figura 4 – Placa de teste rápido *Witness Parvo*[®], em caso de positividade. Notar as numerações da cúpula (1) e da janela de leitura (2 e 3).



Caso o resultado do teste fosse positivo e, se obtido o devido consentimento do proprietário, o paciente era admitido em internamento hospitalar. Em todos os animais internados foi feita uma colheita de sangue venoso através de venopuntura para tubo com EDTA no dia de admissão, para realização de hemograma.

Idealmente a realização de hemograma seria diária enquanto o animal se encontrasse internado. Devido a algumas condicionantes, nomeadamente de índole económica, as colheitas sanguíneas foram efectuadas quando o quadro clínico o justificou e sempre com permissão por parte do proprietário. As análises clínicas hematológicas deixaram de ser feitas quando foi alcançada a normalização de todos os parâmetros, nomeadamente das contagens leucocitárias.

A todos os pacientes internados foram aplicados os protocolos terapêuticos recomendados na bibliografia para casos de gastroenterite por parvovírus (Macintire & Smith-Carr, 1997; Sellon, 2005; McCaw & Hoskins, 2006).

Os animais internados foram monitorizados de forma constante e a sua evolução clínica foi seguida pelo corpo clínico e estudantes estagiários. Toda a informação clínica pertinente foi registada em folha de internamento individual para cada paciente.

3.3 Variáveis estudadas

A partir das fichas de internamento, nomeadamente dos hemogramas, foram retirados os dados seguintes: leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), hemoglobina (g/dl), hematócrito (%), Volume corpuscular médio (VCM) (fl), hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dl), neutrófilos não segmentados (% e $/\mu\text{L}$), neutrófilos segmentados (% e $/\mu\text{L}$), linfócitos (% e $/\mu\text{L}$), monócitos (% e $/\mu\text{L}$), eosinófilos (% e $/\mu\text{L}$) e basófilos (% e $/\mu\text{L}$).

Foram também registados em cada caso as variáveis seguintes: sexo, idade (em meses), raça, peso (em kg), estado vacinal, número de vacinas, data de internamento e de alta, duração de internamento (em dias), desfecho e terapêutica instaurada.

O desfecho considerado neste estudo diz respeito à sobrevivência ou não dos animais, apenas durante o seu período de hospitalização. Em todos os casos de alta, foi solicitada aos proprietários a apresentação em consulta no prazo de uma semana. No entanto, para a maioria dos casos da amostra estudada essa apresentação não se realizou.

3.4 Métodos estatísticos

Para avaliar a existência de associação entre as variáveis ‘Sexo’ e ‘Desfecho’ e as variáveis ‘Estado vacinal’ e ‘Desfecho’ recorreu-se ao teste não paramétrico do Qui-quadrado. Para investigar a existência de diferenças em ambos os sexos na idade de apresentação à consulta, recorreu-se ao teste não paramétrico Mann-Whitney U.

Procedeu-se à construção de uma base de dados recorrendo a uma folha de cálculo do *Microsoft Office Excel 7[®]*. A informação foi posteriormente exportada e analisada utilizando o programa *PASW Statistics 18 for Windows[®]*.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da amostra em estudo

O estudo realizado compreendeu uma amostra com 28 casos. Desses casos, 24 resultaram em alta do paciente e 4 em morte, o que corresponde a 85,7% de sobrevivência e a 14,3% de óbitos. A distribuição de géneros dos casos estudados revela um total de 12 pacientes de sexo feminino (42,9%) e 16 pacientes de sexo masculino (57,1%). Nos indivíduos de sexo feminino ocorreram 10 casos de alta e 4 para os pertencentes ao sexo masculino, com percentagens de alta de 83,3% e 87,5%, respectivamente. Registaram-se 2 óbitos em ambos os sexos, representando 16,7% para fêmeas e 12,5% para machos (Tabela 1). O teste de Qui-quadrado não considerou existência de associação entre as variáveis “Sexo” e “Desfecho” ($p>0,05$).

Tabela 1 – Distribuição dos casos em estudo face ao desfecho de internamento por sexo.

Desfecho		Alta	Morte	Total de casos
Sexo	Feminino	10	2	12
	Masculino	14	2	16
Total		24	4	28

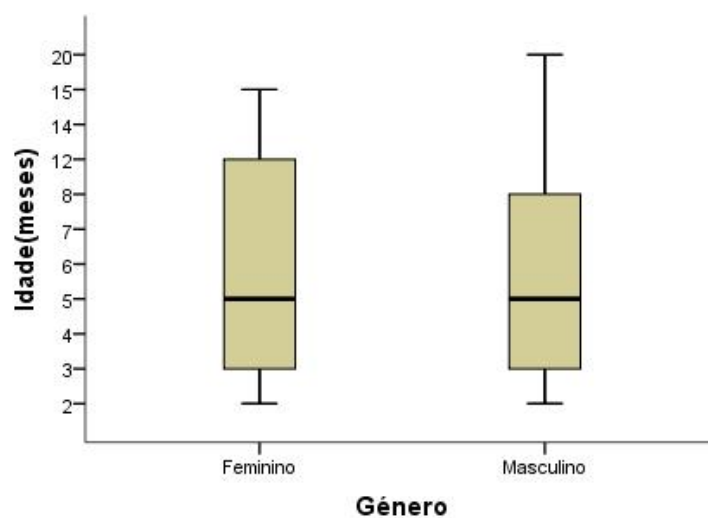
Relativamente à idade dos animais em estudo, a maioria dos pacientes encontrava-se na faixa etária entre os 2 e os 6 meses (67,9%, $n=19/28$). Registou-se a ocorrência de casos em animais com idade compreendida entre os 2 e os 20 meses (Tabela 2). A média de idades dos casos em estudo foi de 6,43 meses, com um desvio padrão de 4,96, e mediana de 4,5 meses.

Tabela 2 – Distribuição da idade em meses dos casos em estudo.

Idade (meses)	Nº de casos	% de casos
2	6	21,4
3	4	14,3
4	4	14,3
5	4	14,3
6	1	3,6
7	1	3,6
8	1	3,6
12	3	10,7
14	2	7,1
15	1	3,6
20	1	3,6
Total	28	100,0

O teste não paramétrico Mann-Whitney U não revelou existência de diferença significativa entre a mediana de idade entre os grupos masculino e feminino ($p=0,925$). O nível de significância considerado foi 0,05. Nas fêmeas, a idade média de apresentação à consulta foi de 6,25 meses e a mediana foi de 4,5 meses, variando entre a idade mínima de 2 meses e a máxima de 15 meses. Nos machos, a idade média nos casos estudados foi de 6,56 meses e a mediana foi de 4,5 meses, atingindo também um valor mínimo 2 meses, mas alcançando uma idade máxima de 20 meses (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Distribuição da idade em meses por sexo.



Em relação à raça dos animais em estudo, foram usadas como referência as raças reconhecidas pela FCI - *Fédération Cynologique Internationale*, organização da qual o nosso país é membro e cujo representante nacional é o Clube Português de Canicultura. O CPC adopta as denominações da FCI.

No estudo da distribuição de casos por raça, é visível que o grupo maioritário é composto por animais de raça indeterminada com 67,9% (n=19/28). Dentro do grupo de animais com raça definida, 7,1% (n=2/28) pertencem à raça Epagneul Bretão, enquanto que as restantes raças representadas, Boxer, Labrador do Retriever, Leão da Rodésia, Pastor Alemão, Pequinês, Perdigueiro e Rafeiro Alentejano, compõem 3,6% (n=1/28) dos casos cada uma (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição das raças por sexo dos animais em estudo.

Raça	Sexo		Nº de casos	% de casos
	Feminino	Masculino		
Boxer	1	0	1	3,6
Epagneul Bretão	0	2	2	7,1
Indeterminada	8	11	19	67,9
Labrador do Retriever	1	0	1	3,6
Leão da Rodésia	0	1	1	3,6
Pastor Alemão	0	1	1	3,6
Pequinês	1	0	1	3,6
Perdigueiro Português	1	0	1	3,6
Rafeiro Alentejano	0	1	1	3,6
Total	12	16	28	100,0

No que se refere à vacinação, foi possível agrupar os pacientes em três categorias. Avaliou-se o número de altas e óbitos consoante o número de actos de vacinação a que o animal foi presente, tendo sido observado que o único animal que possuía duas vacinas faleceu (3,6%; n=1/28), todos os animais (n=6/28) que tinham sido vacinados uma única vez tiveram alta (21,4%) e, em relação aos animais sem qualquer imunização (75%; n=21/28), 18 tiveram alta e 3 faleceram (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição do desfecho em relação ao número de vacinas dos casos estudados.

Número de vacinas	Desfecho		Total de casos
	Alta	Morte	
Duas vacinas	0	1	1
Uma vacina	6	0	6
Sem Vacinas	18	3	21
Total	24	4	28

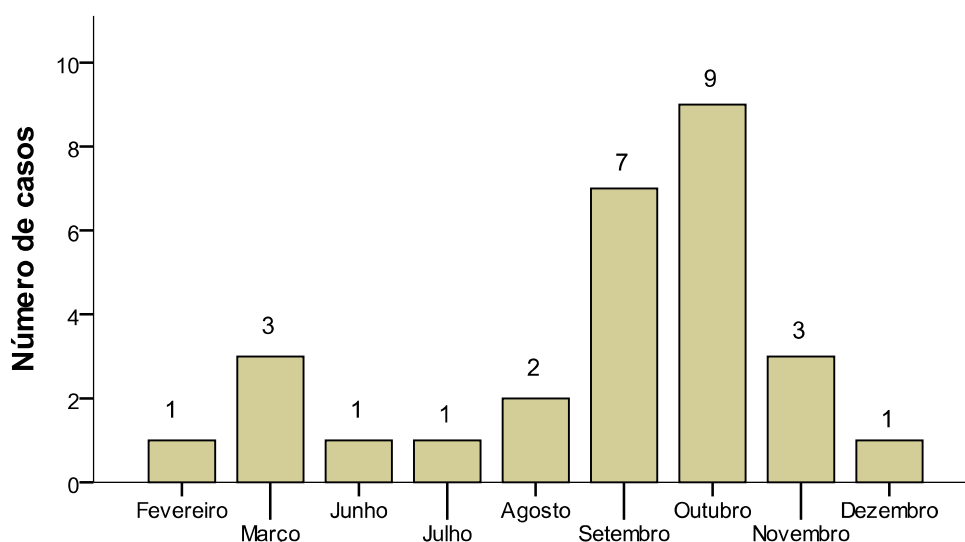
De forma a possibilitar a avaliação de associação entre a vacinação e o desfecho, os dados foram reagrupados e foram constituídas apenas duas categorias (“Pelo menos uma vacina” e “Sem vacinas”) (Tabela 5). O teste de Qui-quadrado não evidenciou existência de associação entre as variáveis “Estado vacinal” e “Desfecho” ($p>0,05$).

Tabela 5 – Distribuição do desfecho face ao estado vacinal dos casos em estudo.

Estado vacinal	Desfecho		Total de casos
	Alta	Morte	
Pelo menos uma vacina	6	1	7
Sem vacinas	18	3	21
Total	24	4	28

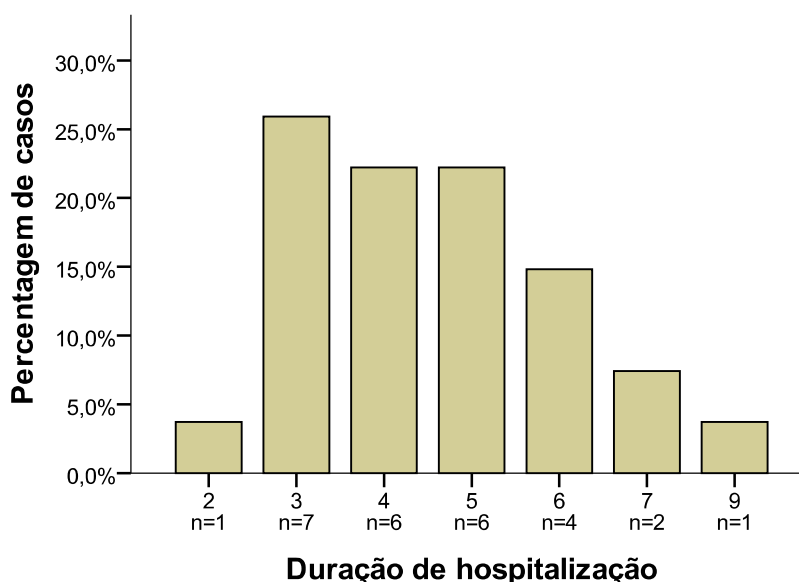
Estudou-se também a distribuição de casos por mês da primeira apresentação à consulta (entrada no estudo). Observou-se que os meses do ano com maior número de casos foram Setembro e Outubro, com 25% ($n=7/28$) e 32,1% ($n=9/28$), respectivamente. Seguem-se os meses de Março e Novembro, ambos com 10,7% ($n=3/28$) dos casos, Agosto com 7,1% ($n=2/28$) de ocorrências e, com menor incidência, os meses de Dezembro, Fevereiro, Julho e Junho, apenas com 3,6% ($n=1/28$) cada um (Gráfico 2). Os meses não mencionados não registaram apresentações de casos.

Gráfico 2 – Distribuição da ocorrência de casos pelos dos meses do ano.



Foi ainda analisada a duração de hospitalização e a sua distribuição. O período de internamento variou entre o mínimo e o máximo de 2 e 9 dias. Cada uma destas situações verificou-se em 3,7% dos casos ($n=1/27$). A maioria dos animais esteve em regime de internamento durante 3 dias, representando 25,9% dos casos ($n= 7/27$). Ocorreram 6 casos com duração de hospitalização de 4 e 5 dias, o que perfaz 22,2% para cada dia ($n= 6/27$). Apenas dois animais estiveram internados durante 7 dias, o que corresponde a 7,4% da amostra ($n=2/27$) (Gráfico 3). A média de duração de hospitalização foi de 4,59 dias. Não havia registo de duração de hospitalização para um dos 28 casos inseridos no presente estudo.

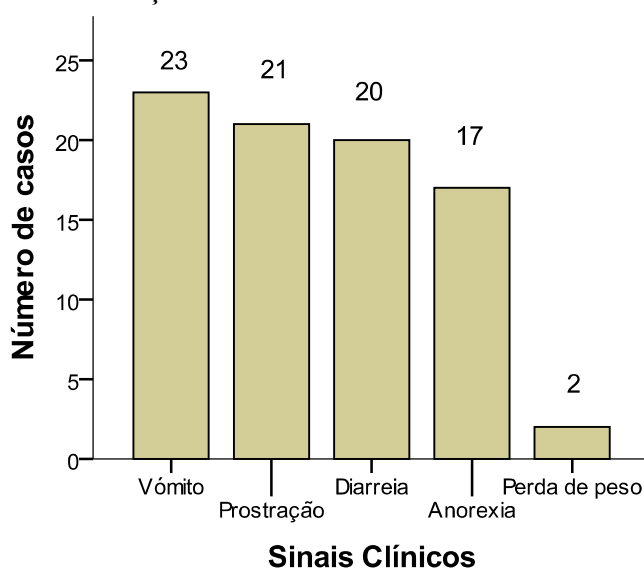
Gráfico 3 – Distribuição da duração de hospitalização em percentagem.



4.2 Caracterização do estímulo iatrotópico e principais queixas dos proprietários dos animais em estudo

Dentro dos sinais clínicos mais frequentemente mencionados pelos proprietários aquando da apresentação dos seus animais à consulta, a queixa mais comum é o vômito, presente em 23 casos, seguida de prostração, a qual ocorreu em 21 dos pacientes em estudo. A diarreia, um dos sinais empiricamente mais associados à gastroenterite a parvovírus, aparece em 3º lugar, ocorrendo em 20 casos. Foi reportada anorexia em 17 dos animais e apenas 2 proprietários mencionaram perda de peso do animal (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Distribuição de sinais clínicos mencionados na consulta.



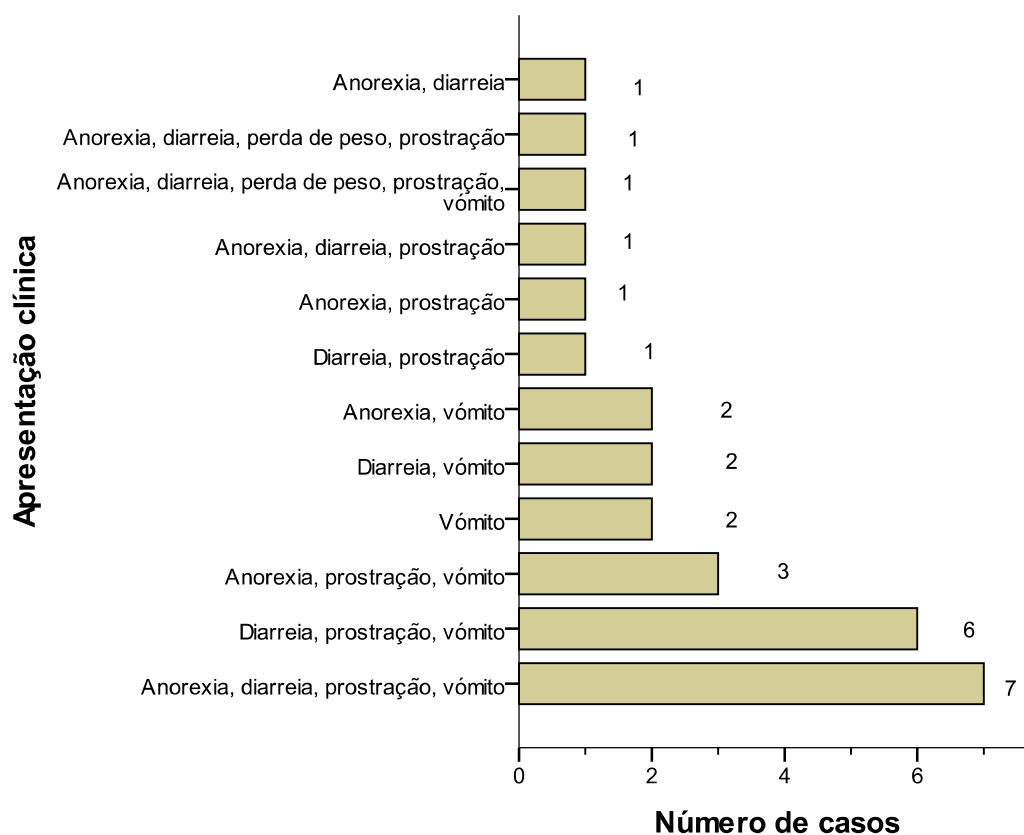
No que concerne ainda aos sinais clínicos relatados pelos proprietários, na apresentação em consulta são referidos em média 2,96 sintomas por animal, com uma mediana e moda de 3 sinais clínicos por caso. O número de sinais clínicos descritos por animal oscila entre o mínimo de 1 (7,1% dos casos) e o máximo de 5 (3,6% dos casos). Uma fracção apreciável dos proprietários mencionou 3 sinais clínicos (35,7% dos casos), foram enumerados 2 sinais clínicos em 25% dos casos e nos restantes casos (28,6%) foram referidos 4 sinais clínicos (Tabela 6).

Tabela 6 – Número de casos e frequência de sinais clínicos mencionados na consulta.

Número de sinais clínicos	Nº de casos	% de casos
1	2	7,1
2	7	25
3	10	35,7
4	8	28,6
5	1	3,6
Total	28	100

No que respeita às variadas apresentações clínicas dos animais em estudo, os pacientes exibiram combinações variadas de 5 sinais clínicos, como seja anorexia, diarreia, perda de peso, prostração e vômito. O quadro clínico mais frequente é composto pela associação de anorexia, diarreia, prostração e vômito, o qual esteve presente em 25% (n=7/28) dos casos. Apenas 7,14% dos casos (n=2/28) apresentaram somente um sinal clínico, vômito, sendo que os restantes 92,86% (n=26/28) possuíam uma qualquer combinação de pelo menos dois sintomas (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Número de casos para cada apresentação clínica dos animais em estudo.



4.3 Resultados do leucograma

Procedeu-se ao estudo da evolução da contagem absoluta média de leucócitos, bem como da contagem absoluta média de neutrófilos segmentados, neutrófilos não segmentados linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos durante do período de internamento dos animais incorporados no estudo. Foi calculado para cada dia o valor médio e o desvio padrão das referidas contagens e registados o número de casos e valores mínimo e máximo correspondentes (Tabela 7).

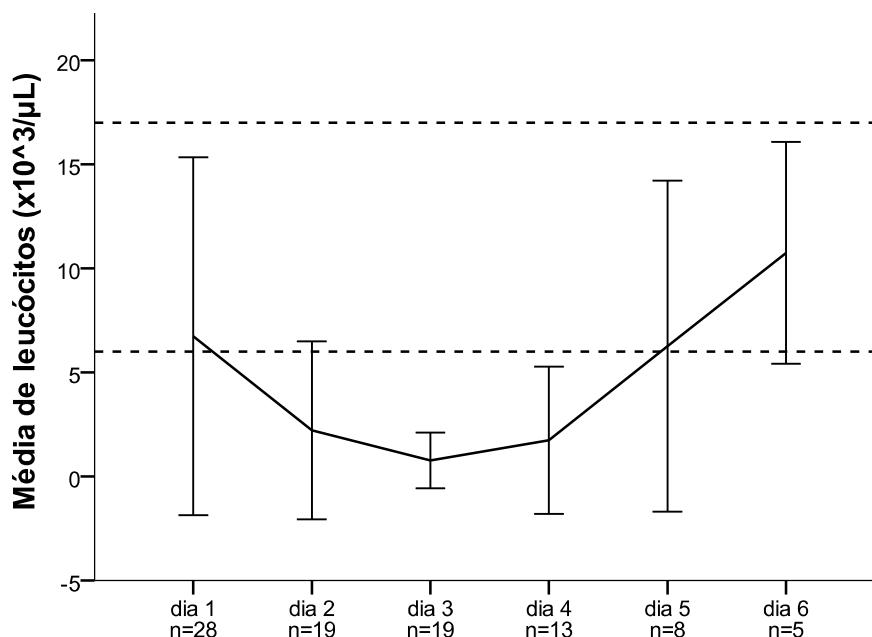
Tabela 7 – Resultados para o leucograma, incluindo os valores mínimo e máximo, média e desvio padrão diários.

		Nº de casos (n)	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Dia 1	28	0,45	23,40	6,75	4,99
	Dia 2	19	0,40	19,10	4,79	4,74
	Dia 3	19	0,26	12,60	4,73	3,76
	Dia 4	13	0,36	14,60	5,48	4,80
	Dia 5	8	0,62	18,00	6,89	5,51
	Dia 6	5	7,43	12,80	10,09	2,12
	Dia 7	2	15,50	21,80	18,65	4,45
Neutrófilos segmentados ($/\mu\text{L}$)	Dia 1	26	6	19422	5568,58	4113,45
	Dia 2	16	144	8085	3028,88	2727,69
	Dia 3	16	17	9828	3806,44	3079,36
	Dia 4	11	10	12410	3919,82	3950,99
	Dia 5	8	6	12780	4821,50	4213,95
	Dia 6	5	4856	10752	7456,40	2319,62
	Dia 7	2	13175	16350	14762,50	2245,06
Linfócitos ($/\mu\text{L}$)	Dia 1	26	130	1413	796,35	364,69
	Dia 2	16	266	6876	1273,63	1605,75
	Dia 3	16	12	1664	909,25	542,33
	Dia 4	11	143	2693	1220,45	764,67
	Dia 5	8	186	2340	1155,25	695,02
	Dia 6	5	896	2268	1638,40	576,66
	Dia 7	2	1860	3052	2456,00	842,87

Monócitos (/μL)	Dia 1	26	72	2599	670,08	650,67
	Dia 2	16	88	12033	1116,44	2923,70
	Dia 3	16	105	1786	673,81	435,19
	Dia 4	11	206	5130	1064,00	1409,75
	Dia 5	8	278	2880	855,13	946,19
	Dia 6	5	297	1278	892,60	378,09
	Dia 7	2	72	2599	670,08	650,67
Eosinófilos (/μL)	Dia 1	26	0	518	128,15	165,27
	Dia 2	16	0	303	43,13	95,74
	Dia 3	16	0	1184	120,31	310,19
	Dia 4	11	0	256	86,45	97,19
	Dia 5	8	0	362	66,75	127,65
	Dia 6	5	0	256	100,80	107,23
	Dia 7	2	0	218	109,00	154,15

4.4 Evolução da contagem total média de leucócitos durante o período de hospitalização

Gráfico 6 – Evolução da média da contagem de leucócitos durante o internamento, em valor absoluto. I.C. 95%



Com os hemogramas realizados aos pacientes foram elaborados gráficos, por forma a possibilitar o estudo da evolução dos vários componentes hematológicos durante o período de internamento. Os valores para cada parâmetro em estudo (em todos os casos) foram agrupados por dia, sendo que o número de casos diminui pois a duração de hospitalização é variável.

Analisou-se o comportamento da contagem leucocitária absoluta numa extensão de 6 dias (Gráfico 6). As linhas a tracejado representam os valores de referência mínimo e máximo. É observável que no dia de apresentação (e entrada no estudo), os animais possuem uma contagem de leucócitos média dentro do intervalo de referência ($6,75 \times 10^3/\mu\text{L}$). Não obstante, existem pacientes que se apresentam à consulta com leucopénia grave, atingindo $0,45 \times 10^3$ leucócitos/ μL . Nos dias 2, 3 e 4 instalou-se uma leucopénia e as contagens médias só regressam a valores normais no dia 5.

Entre os dias 1 e 2 existe uma diminuição visível do valor médio de leucócitos, o que se traduz no aparecimento de leucopénia ($4,79 \times 10^3/\mu\text{L}$). Ao terceiro dia de internamento é atingida a contagem menor, alcançado, em média $4,73 \times 10^3$ leucócitos/ μL . Também neste dia é obtida a contagem leucocitária individual mais baixa, a qual desce até a $0,26 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Do 3º para o 4º dia começou a ser notória uma recuperação do estado de leucopénia. A tendência para a redução do número de leucócitos pára e, contrariando o decréscimo dos dias anteriores, a contagem leucocitária média volta a encontrar-se em valores próximos ao limiar inferior do intervalo de referência ($5,48 \times 10^3/\mu\text{L}$). A nível individual, continuam a existir animais com leucopénia acentuada ao 4º dia de internamento, sendo a contagem menor de $0,36 \times 10^3$ células/ μL .

A evolução entre o 4º e o 5º dia continua a ser no sentido da recuperação, e a contagem leucocitária média chega aos $6,89 \times 10^3$ leucócitos/ μL . Ao quinto dia de hospitalização ainda perduram animais com leucopénia, pois o valor mínimo alcançado é de $0,62 \times 10^3$ leucócitos/ μL . Apenas no dia 6 de internamento já não existem pacientes com leucopénia. A contagem de leucócitos mínima para este dia já está dentro dos valores referenciais ($7,436 \times 10^3/\mu\text{L}$) e são alcançadas contagens médias confortavelmente dentro do intervalo de referência ($10,09 \times 10^3/\mu\text{L}$).

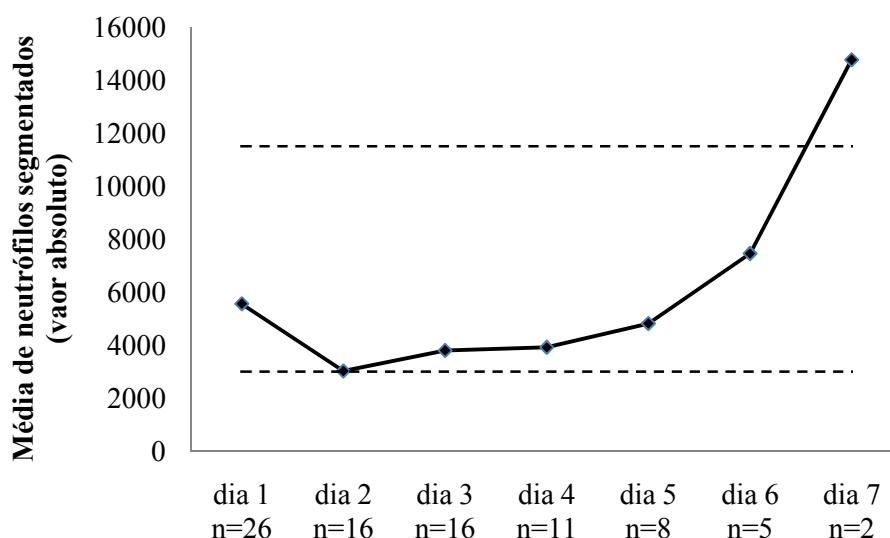
No dia 7 é alcançado o valor médio mais elevado, chegando a contagem aos $18,65 \times 10^3$ leucócitos/ μL (não representado no gráfico 6).

4.5 Evolução da contagem absoluta média de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos durante do período de internamento

Uma vez que o intuito foi observar o comportamento dos diferentes leucócitos ao longo do período de internamento, não foram incluídos os gráficos respeitantes aos neutrófilos não segmentados e aos basófilos. As contagens médias que foram atingidas encontravam-se invariavelmente no valor 0 e a sua exportação para um traçado gráfico não traduz qualquer interesse académico ou valor científico. Os resultados obtidos encontram-se no Anexo II.

Por esta razão apenas se apresentam os gráficos para as restantes variedades de leucócitos (neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos e eosinófilos), gráficos estes que foram realizados sob as premissas supracitadas para o gráfico 6.

Gráfico 7 – Evolução da média da contagem de neutrófilos segmentados durante o internamento, em valor absoluto.



Foi realizada a análise da evolução das contagens dos neutrófilos segmentados médias durante o internamento (Gráfico 7). À semelhança do que se verificou para os leucócitos, no dia de apresentação à consulta os animais possuíam uma contagem de neutrófilos segmentados média dentro de valores normais (5568,58/ μL), havendo, no entanto, indivíduos com contagens manifestamente reduzidas (6/ μL).

Também as contagens de neutrófilos segmentados médias desceram para valores perto do limiar mínimo entre os dias 2 e 4, aumentando ao dia 5.

No dia 2 de internamento registou-se uma contagem média de 3028,88 neutrófilos/ μL . Esta alteração constitui o valor médio menor observado, apesar de não ser

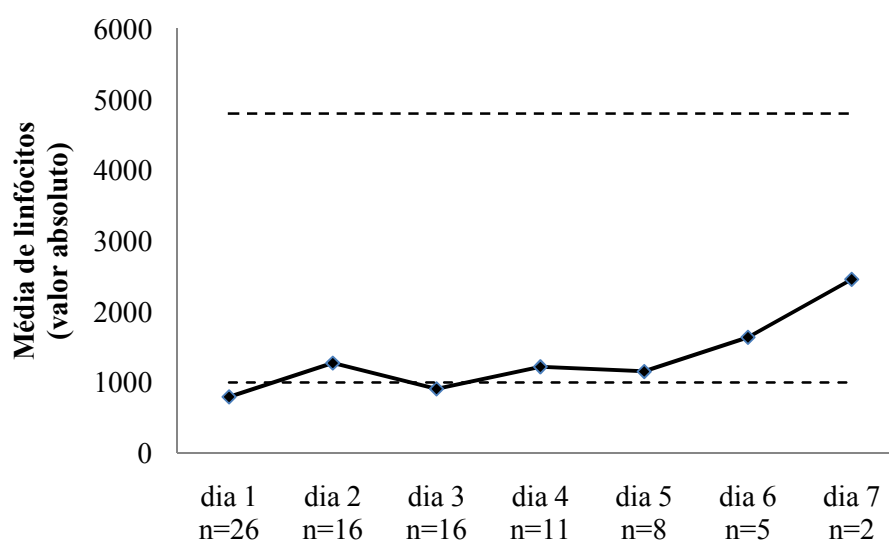
correspondente ao menor valor mínimo individual ($144/\mu\text{L}$) e não consistir uma neutropénia.

Ao 3º dia existe uma ligeira subida na contagem de neutrófilos segmentados média ($3806,44/\mu\text{L}$), embora continue a estar presente a neutropénia em alguns indivíduos, pois o valor mínimo foi de 17 neutrófilos/ μL .

A partir do dia 4 começou a desenhar-se uma recuperação da contagem de neutrófilos segmentados média, a qual perdura até ao dia seguinte. Entre os dias 5 e 6 observou-se um acréscimo ainda mais evidente da contagem de neutrófilos segmentados média, alcançando as $7456,4$ células/ μL . Da mesma forma que se registou na evolução leucocitária, somente a partir do dia 6 não se registam animais com neutropénia, pois o valor mínimo é de 4856 neutrófilos/ μL .

Também em paralelo com as contagens leucocitárias, no dia 7 existia uma neutrofilia ($14762,5/\mu\text{L}$). Esta situação ocorreu em todos os pacientes, pois a contagem mínima foi de 13175 neutrófilos/ μL .

Gráfico 8 – Evolução da média da contagem de linfócitos durante o internamento, em valor absoluto.



Procedeu-se ao estudo das alterações sofridas pelas contagens de linfócitos médias durante a hospitalização (Gráfico 8). Os linfócitos apresentaram um comportamento diferente do que fora observado para leucócitos e neutrófilos segmentados. No dia de apresentação à consulta a contagem de linfócitos média encontrava-se num nível inferior ao intervalo de referência ($769,35/\mu\text{L}$). Apesar desta observação, o valor máximo individual para este dia foi de 1413 linfócitos/ μL , indicando que nem todos os pacientes se apresentaram com linfopénia.

No segundo dia ocorreu uma subida da contagem linfocitária média (1273,63 linfócitos/ μ L) e uma recuperação da linfopénia. Porém, ainda se registaram valores diminuídos de linfócitos em alguns animais (266/ μ L).

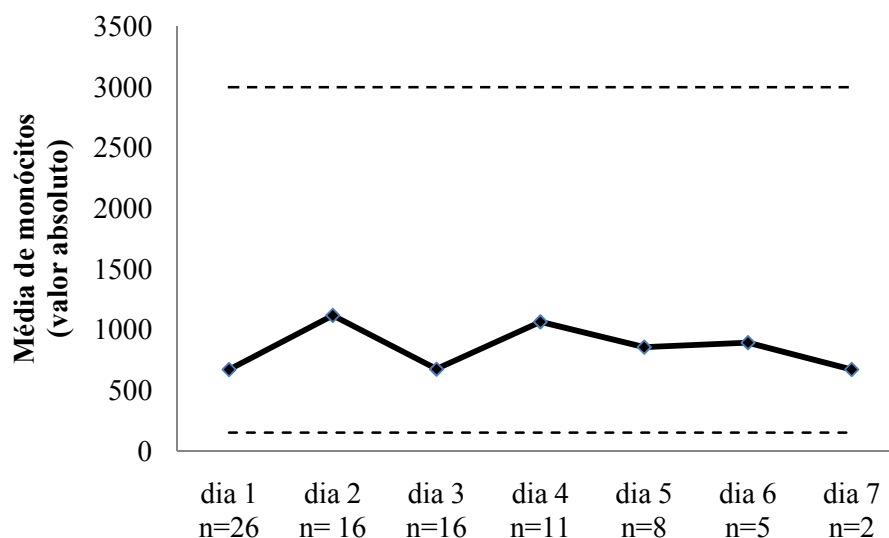
Ao 3º dia há nova redução da contagem de linfócitos média, a qual decresce até às 909,25 células/ μ L. Continuaram os casos de linfopénia acentuada (valor mínimo de 12 linfócitos/ μ L) e de contagens dentro dos valores normais (valor máximo 1664 linfócitos/ μ L).

Registou-se uma segunda subida da contagem linfocitária média ao 4º dia (1220,45 células/ μ L), marcando o fim da linfopénia. Não obstante, há pacientes que permaneceram com contagens profundamente baixas (143 linfócitos/ μ L).

Entre o 4º e 5º dia ocorreu uma ligeira descida da contagem de linfócitos média, apesar de não haver uma reversão para a linfopénia (1155,25 linfócitos/ μ L). Ainda se registaram casos de pacientes com linfopénia (valor mínimo 186 células/ μ L).

No dia 6 a contagem linfocitária média permaneceu com tendência para subir (1638,4 linfócitos/ μ L), subida que também ocorreu a título individual, embora ainda perdurassem casos de animais com linfopénia (valor mínimo diário 896 células/ μ L). Apenas no dia 7 não existiam casos de linfopénia e a contagem de linfócitos média cresceu para os 2456 linfócitos/ μ L.

Gráfico 9 – Evolução da média da contagem de monócitos durante o internamento, em valor absoluto.



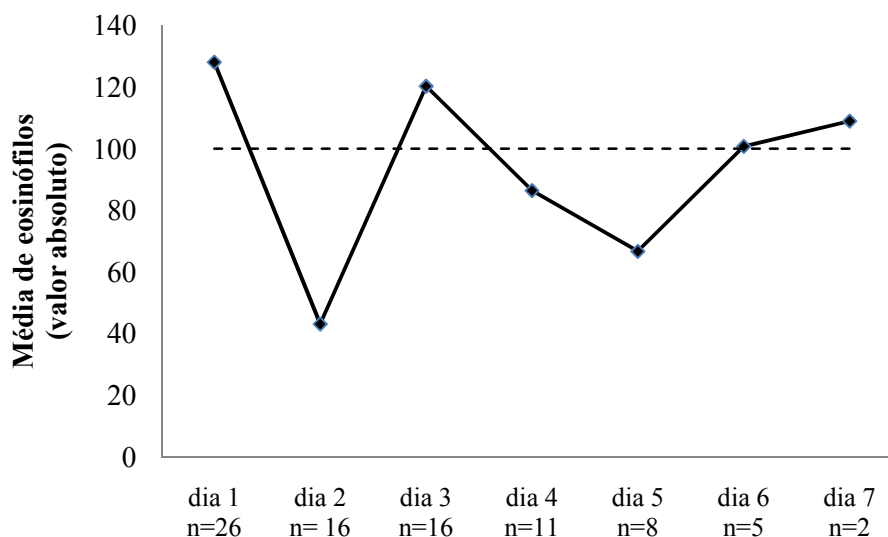
Realizou-se a análise da evolução das contagens de monócitos médias ao longo do período de internamento (Gráfico 9). As contagens de monócitos médias nunca atingiram valores inferiores ao intervalo de referência, como pode ser observado no gráfico 9. Não obstante, existiram valores de contagens individuais inferiores ao dito intervalo durante os primeiros 3 dias, o que indica a presença de animais com

monocitopénia (72 monócitos/ μL , 88 monócitos/ μL e 105 monócitos/ μL , respectivamente). As contagens mínimas para os dias em causa apresentaram uma tendência crescente, até que atingiram no quarto dia os 206 monócitos/ μL , valor que já se encontrava dentro do intervalo de referência.

Foi no primeiro dia que a contagem de monócitos média foi menor, alcançando as 670,08 células/ μL . No dia 2 este valor subiu para os 1116,44 monócitos/ μL , voltando a decrescer para os 673,81 monócitos/ μL ao 3º dia.

Ao 4º dia a contagem de monócitos média tornou a subir, atingindo os 1064 monócitos/ μL e mantendo-se estacionária no 5º e 6º dia (855,13 monócitos/ μL e 892,6 monócitos/ μL , respectivamente). No dia 7 ocorreu uma ligeira descida na contagem média, porém não houve reversão para a monocitopénia (670,08/ μL).

Gráfico 10 – Evolução da média da contagem de eosinófilos durante o internamento, em valor absoluto.



As alterações das contagens de eosinófilos médias foram estudadas (Gráfico 10). A linha a tracejado representa o marco inferior do intervalo de referência. Optou-se pela eliminação da linha que corresponde ao limite superior do intervalo de referência (que é de 1250 eosinófilos/ μL), uma vez que a sua inclusão modifica grandemente a escala do gráfico e implica perda de pormenor do mesmo. É possível observar que no dia de apresentação à consulta, a contagem média se encontrava dentro do intervalo de referência (128,15 eosinófilos/ μL). Porém, ao dia 2 este valor sofreu uma grande descida, passando para os 43,13 eosinófilos/ μL . Esta situação traduz a ocorrência de eosinopénia.

No dia 3 voltou a surgir uma subida na média de eosinófilos, sendo que o valor atingido se encontrava abrangido pelo intervalo de referência (120,31 eosinófilos/ μL).

Tornou a haver descida da contagem média de monócitos ao 4º e 5º dia, sendo alcançados valores de 86,45 eosinófilos/ μ L e de 66,75 eosinófilos/ μ L. Ambas estas contagens médias representaram eosinopénia, apesar de não tão marcadas como ao dia 2.

Ao 6º dia observou-se uma recuperação da contagem de eosinófilos média, voltando a ser ultrapassada a barreira inferior do intervalo de referência. O valor médio atingido neste dia foi de 100,8 eosinófilos/ μ L. Ao 7º dia continuou a escalada na contagem de eosinófilos média, obtendo-se 109 eosinófilos/ μ L.

Durante todos os 7 dias a contagem mínima foi de 0 eosinófilos/ μ L.

5 DISCUSSÃO

A estripe original PVC-2 foi descrita como patogénica em 1978 por Appel, Cooper, Greisen e Carmichael. A enterite causada por PVC-2 é tida como a doença infecciosa mais comum em canídeos (McCaw & Hoskins, 2006; Sellon, 2005).

Para a inclusão de pacientes neste estudo foi necessária a confirmação do diagnóstico clínico, recorrendo para isso ao teste de IMR. O diagnóstico clínico de parvovirose surge em casos nos quais exista história pregressa suspeita e quadros clínicos cujos sintomas incluam vômito, diarreia, prostração e anorexia (Appel *et al.*, 1969; Potgieter *et al.*, 1981; Macintire & Smith-Carr, 1997; Tennant, 2001; Sellon, 2005). Porém, o diagnóstico clínico de PVC-2 é equívoco, uma vez que existem outros agentes etiológicos responsáveis por quadros de gastroenterite em cães.

Assim sendo, um diagnóstico definitivo de infecção por parvovírus requer confirmação através de testes laboratoriais. Neste estudo, como na prática clínica, utilizou-se para esta finalidade o teste rápido de IMR para a pesquisa de antígenos fecais de parvovírus nos pacientes com sintomatologia compatível. Este teste tem uma boa especificidade e sensibilidade, 99,5% e 96,7%, respectivamente (Merial, 2007). No entanto, possui também algumas limitações. A eliminação fecal do vírus geralmente ocorre entre o 3º e o 7º dia pós infecção (que corresponde ao 5º a 7º dia de manifestação clínica da doença), o que traduz um período bastante curto para a detecção do vírus (McCaw & Hoskins, 2006; Tennant, 2001). A vacinação com vacinas vivas atenuadas, nos 5 a 12 dias anteriores, gera resultados falsos positivos. Por este motivo não foram inseridos neste estudo animais que tivessem sido sujeitos a vacinação com vacina viva atenuada nos 15 dias anteriores à apresentação em consulta.

Apesar de os testes de ELISA negativos não excluírem a possibilidade de infecção por PVC-2, estes pacientes não foram abarcados pelo estudo por não cumprirem os critérios de inclusão estipulados.

Idealmente ter-se-ia recorrido a outras técnicas de diagnóstico, como o PCR ou o RT-PCR, mas estas comportam gastos onerosos em equipamento e reagentes, necessitam de operadores especializados e são extremamente morosas, o que faz o seu uso hospitalar impraticável.

A mortalidade registada neste estudo foi de 14,3%. Noutros estudos realizados por diferentes autores com premissas e condições semelhantes a mortalidade foi cerca de 16% (Goddard *et al.*, 2008; Frazão, 2008).

Há outros trabalhos que demonstram valores ainda mais reduzidos, perto dos 8% (Mantione & Otto, 2005). O estudo realizado em 2008 por Goddard e colegas decorreu em Onderstepoort, na África do Sul e o estudo de 2005 de Mantione e Otto foi feito na Pensilvânia, nos Estados Unidos da América. Além de não serem conhecidos os protocolos terapêuticos e as condições em que os estudos foram feitos, é possível que a distribuição geográfica das várias estirpes influa na gravidade de doença e quadro clínicos, o que se repercute na mortalidade. Outro factor condicionante são as limitações financeiras, as quais podem limitar as opções de tratamento médico. No nosso estudo, um dos critérios de inclusão é o consentimento dos proprietários. Como tal, é possível que casos mais graves não tenham recebido atenção médica, pois os custos de tratamento da enterite por PVC podem ser elevados (Prittie, 2004).

Num estudo realizado por Houston e colegas, concluiu-se que, em animais com mais de 6 meses de idade, os machos inteiros têm o dobro da probabilidade de desenvolver enterite por PVC-2 em comparação com fêmeas inteiras.

No presente estudo, 57,1% dos pacientes pertenciam ao sexo masculino, porém, o teste de Qui-quadrado não demonstrou associação entre as variáveis ‘Sexo’ e ‘Desfecho’, o que pode indicar uma maior representatividade deste género ou espelhar um número mais elevado de machos na população de canídeos no nosso país.

Quando analisada a idade dos pacientes em estudo é notório que a maioria dos animais se encontra na faixa etária dos 2 aos 6 meses de idade, havendo grande representatividade das faixas dos 2 a 5 meses. Estes dados são concordantes com o descrito por outros autores que afirmam que a maioria dos pacientes possui entre 6 semanas a 6 meses de idade (Smith-Carr *et al.*, 1997; McCaw & Hoskins, 2006; Goddard *et al.*, 2008).

Tendo em conta que os animais nesta faixa etária compõem o grupo mais susceptível, a sua imunização reveste-se de capital importância. A implementação e cumprimento de um calendário vacinal adequado é uma das principais práticas clínicas na prevenção da infecção por PVC-2 (Sellon, 2005). É também importante a adopção de medidas de biossegurança para maior protecção de um cachorro contra a exposição ao vírus. Sendo um vírus ubiquitário e de extrema resistência no meio ambiente, é fundamental informar

os proprietários que os animais devem ser resguardados, não frequentando espaços públicos nem tendo contacto com animais cujo estado vacinal seja desconhecido.

A maioria dos animais presentes neste estudo era de raça indeterminada, consistindo 67,9% dos casos (n=19/28). As raças dos restantes pacientes foram agrupadas consoante as designações da FCI e do CPC, sendo mais representativa a raça Epagneul Bretão. As restantes raças presentes neste estudo foram a raça Boxer, a Labrador do Retriever, a Leão da Rodésia, a Pastor Alemão, a Pequínês, a Perdigueiro Português e a Rafeiro Alentejano. Já foi descrito que as raças Labrador do Retriever e Pastor Alemão têm maior risco de contrair infecção por PVC-2, mas não as restantes raças presentes no nosso estudo (Brunner & Swango, 1985; Houston *et al.*, 1996; Smith-Carr *et al.*, 1997; McCaw & Hoskins, 2006). Os presentes resultados podem estar relacionados com a localização geográfica e a popularidade de determinadas raças no nosso país. Este estudo foi realizado numa zona em que uma porção apreciável da população pratica a caça, o que pode explicar as presenças das raças Epagneul Bretão e Perdigueiro Português. A raça Boxer continua a gozar de bastante popularidade a nível nacional, e a sua extensa representação já foi mencionada noutro estudo (Frazão, 2008). No caso da raça Rafeiro Alentejano, por ser uma raça nacional, dificilmente se viu incluída em estudos de susceptibilidade feitos noutros países onde a sua expressão seja reduzida. Tendo em conta que as referências encontradas são quase exclusivamente estrangeiras, pode atribuir-se as diferenças à representatividade de cada raça a nível local e nacional.

Foi também estudado o estado vacinal dos animais. No que diz respeito às imunizações, apenas 3,6% dos casos (n=1/28) tinham sido vacinados duas vezes e 21,4% dos pacientes (n= 6/28) tinham sido apresentados para vacinação uma vez, o que faz com que 75% dos animais não tivessem recebido qualquer imunização prévia (n=21/28). Apesar do número de animais não vacinados ser bastante elevado, o teste de Qui-quadrado não conseguiu evidenciar qualquer associação entre o estado vacinal e o desfecho. Um estudo realizado em 2010 na Grécia por Kalli e colegas possuía uma amostra onde 48% dos animais tinha sido vacinado pelo menos uma vez. A grande discrepância entre este valor e o do nosso estudo poderá ser devida à diferença de mentalidades dos proprietários de ambos os países. É também de notar que, na zona em que foi feito o nosso estudo, muitos dos proprietários optam por cumprir apenas a vacinação anti-rábica obrigatória.

Deve ser ainda mencionado que o único paciente que fora imunizados duas vezes não sobreviveu. Esta situação poderá ser devida à interferência dos anticorpos vacinais com os maternos, deixando o cachorro susceptível a infecção por PVC-2 e constituindo uma falha vacinal.

Os meses do ano com maior ocorrência de casos foram os de Setembro a Novembro, perfazendo um total de 67,8% dos casos. Estes resultados apresentam alguma concordância com um estudo realizado no ano de 2008 por Gombac, Svára, Tadić e Pogacnik, que identificaram Agosto, Setembro e Outubro como os meses de maior incidência de casos de parvovirose canina. Num outro estudo realizado por Houston e colegas, os meses de Julho, Agosto e Setembro surgiram também como épocas de incidência mais elevada.

No nosso estudo o mês de Novembro constituiu um período relevante, decorrendo 10,7% de casos neste mês. Frazão observou a mesma tendência, sugerindo como explicação as condições climáticas amenas da Península de Setúbal, onde se registam diferenças de temperatura ambiente pouco marcadas quando comparadas com o Canadá e a Eslovénia, países onde foi estudada a sazonalidade da parvovirose (Houston *et al.*, 2006; Gombac *et al.*, 2008; Frazão, 2008).

A duração do período de hospitalização constituiu um parâmetro de interesse. No presente trabalho, para que um paciente recebesse alta clínica era necessário que se verificassem várias condições. Nenhum animal pode abandonar o internamento enquanto não se alimentar de livre vontade e os seus parâmetros sanguíneos hematológicos se encontrarem dentro dos intervalos de referência. Verificou-se que um grande número de animais esteve internado por 3 dias, o que é concordante com um estudo realizado por Kalli e colegas (Kalli *et al.*, 2010). No nosso estudo a duração média de hospitalização foi de 4,59 dias, valor inferior aos 5,7 dias registados por esses autores. Não são por nós conhecidos os critérios para a atribuição de alta clínica nem a terapêutica adoptada nesse estudo. É possível que as diferenças entre os estudos se justifiquem pelo rigor dos critérios de alta médica e/ou pela eficácia dos protocolos médicos adoptados.

Os sinais clínicos mais frequentes aquando da apresentação à consulta foram o vómito (82,1%; n=23/28), a prostração (75%; n=21/28), a diarreia (71,4%; n=20/28), a anorexia (60,7%; n=17/28) e a perda de peso (7,1%, n=2/28). Num estudo realizado por Kalli e

colegas no ano de 2010 observou-se uma frequência diferente dos mesmos sintomas: anorexia (72,3%), prostração (69%), vômito (57,4%) e diarreia (53,2%) (Kalli *et al.*, 2010). Estas discrepâncias podem ser explicadas pelas variantes percepções dos proprietários, uma vez que os animais não têm o mesmo acompanhamento e que a atenção e número de horas dedicadas pelos proprietários aos animais de estimação são muito inconstantes. É também possível que, uma vez que este estudo foi realizado na Grécia, a frequência das várias estirpes de PVC-2 seja diferente da nacional, o que poderá explicar a discordância de apresentações clínicas.

Os quadros clínicos apresentados na consulta são bastante variáveis, porém 7 pacientes foram admitidos a internamento com a mesma sintomatologia: anorexia, diarreia prostração e vômito.

A leucopénia é uma alteração comum do leucograma na infecção por parvovírus, em especial durante os primeiros 4 a 5 dias de doença (Appel *et al.*, 1978; Osterhaus *et al.*, 1980; Otto *et al.*, 1997; Mantione *et al.*, 2005; Goddard *et al.*, 2008). No presente estudo a maioria dos animais encontrou-se com leucopénia no decorrer do seu internamento. Ao 2º e 3º dia registou-se a existência de leucopénia, com contagens de leucócitos médias de $4,79 \times 10^3/\mu\text{L}$ e de $4,73 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente. A contagem leucocitária média no dia 4 também reflecte uma leucopénia ($5,48 \times 10^3/\mu\text{L}$), se bem que seja um valor próximo do mínimo do intervalo de referência ($6 \times 10^3/\mu\text{L}$).

Estes dias podem corresponder aos primeiros 4 a 5 dias da doença, uma vez que é possível que os proprietários não procurem assistência veterinária imediatamente após o início dos sinais clínicos. Para além disto, existem factores que predispõem à ocorrência de quadros clínicos mais graves, como a idade do animal, existência de stress, composição genética (com variações de susceptibilidade para diferentes raças), infecções concomitantes devidas a parasitas intestinais ou bactérias, presença de Ac maternos, estado vacinal, “stress intestinal” e a magnitude e duração do estado de virémia (McCaw & Hoskins, 2006; Appel *et al.*, 1978; Sellon, 2005; Tennant, 2001).

Deve ainda ser tido em conta que os animais podem ser apresentados à consulta em diferentes alturas da doença. Isto significa que alguns cachorros se apresentam com leucopénia com contagens muito reduzidas, enquanto noutros casos pode ainda não ter ocorrido ou pode não vir a ocorrer a lesão medular que desencadeia a leucopénia. Todos estes factores são determinantes na instalação e gravidade da leucopénia observada.

As alterações na contagem total de leucócitos são causadas principalmente por mudanças no número de neutrófilos e linfócitos (Jain, 1986; Latimer & Prasse, 1994; Schultze, 2000).

Após uma leucopénia com uma duração de cerca de 3 dias, existe uma clara resposta medular com reposição da linha mielóide e consequente produção e libertação de leucócitos. A contagem leucocitária média que se observou ao dia 7 ($18,65 \times 10^3/\mu\text{L}$) não é inesperada, uma vez que a leucocitose transitória é uma ocorrência comum durante o período de convalescença de gastroenterite a parvovírus (Potgieter *et al.*, 1981).

Os neutrófilos são tipo leucocitário mais frequente no sangue do cão e constituem a linha de defesa primária contra microorganismos. A neutropénia pode ser profunda em infecções por PVC-2, em particular nos casos graves (Appel *et al.*, 1978; Potgieter *et al.*, 1981; Macintire & Smith-Carr, 1997; McCaw & Hoskins, 2006; Sellon, 2005).

À semelhança do que fora previamente afirmado por outros autores, no nosso estudo é possível observar um paralelismo entre o comportamento dos neutrófilos segmentados e as contagens leucocitárias (Latimer & Rakich, 1989; Brown & Rogers, 2001). A evolução dos neutrófilos segmentados condicionou o comportamento leucocitário. A redução da contagem de neutrófilos segmentados, a qual se aproxima de neutropénia, repercute-se na instalação de leucopénia. Apesar de não se registar a ocorrência de neutropénia, nos dias 2, 3 e 4 foram atingidas contagens de neutrófilos segmentados médias próximas do limite inferior do intervalo de referência ($3000/\mu\text{L}$). A neutropénia desenvolve-se 5 a 6 dias depois da ocorrência dos danos na medula óssea, sendo mais grave aproximadamente 5 a 8 dias após a infecção viral (Weiss, 2000; Smith, 2000). Não é possível conhecer-se o intervalo decorrido entre a infecção viral ou a ocorrência de lesões medulares e a apresentação à consulta. Contudo, é possível observar uma tendência de redução do número de neutrófilos segmentados ao longo de dois dias. Esta sofre uma reversão, passando a ser notória uma recuperação da contagem de neutrófilos segmentados média e uma escalada para valores bastante distantes dos mínimos de referência. Este comportamento é simultâneo ao que se observou para os leucócitos no que diz respeito às tendências de evolução das contagens e ao tempo em que decorreram.

É sabido que os cães possuem uma reserva medular de neutrófilos equivalente a 5 dias, o que explica o período entre a lesão medular e o advento da neutropénia (Deubeleiss *et al.*, 1975; Latimer & Prasse, 1994; Smith, 2000). A duração desta reserva pode também justificar o facto de no nosso trabalho não ter sido observada neutropénia. Sabendo que

o decurso da doença é próprio de cada indivíduo e que a altura de apresentação é também variável, é possível que enquanto alguns animais estivessem com neutropénia marcada, outros ainda possuísem alguma reserva medular. Isto poderá ter colocado os valores médios calculados perto do limite da neutropénia aos dias 2 e 3 (3028,88/ μ L e 3806,44/ μ L, respectivamente), influenciando os resultados obtidos.

Uma vez que a semi-vida dos neutrófilos é muito reduzida, uma interrupção da sua produção medular, mesmo passageira, é preocupante (Appel *et al.*, 1978; Potgieter *et al.*, 1981).

Outros autores declaram a linfopénia transitória como a alteração hematológica mais consistente na gastroenterite por parvovírus (Pletcher *et al.*, 1979; Potgieter *et al.*, 1981; Macartney *et al.*, 1984; Brunner & Swango, 1985; Decaro *et al.*, 2009b; Decaro *et al.*, 2009c). Neste estudo a maioria dos animais apresentou-se à consulta com linfopénia (64,3%, n=18/28), o que é concordante com publicações anteriores. Apesar de a contagem de linfócitos média só revelar a existência de linfopénia no dia 1 e 3, as contagens individuais mostram a presença de animais com linfopénia desde o dia 1 ao dia 6, inclusivamente.

Em animais sãos, o linfócito é o segundo tipo de leucócito mais comum, o que explica a sua responsabilidade na origem de leucopénia. Dado que o PVC-2 causa destruição de linfócitos, atrofia de tecidos linfóides e depleção das subpopulações linfocitárias, a linfopénia é uma alteração expectável.

No nosso estudo não se registaram valores médios de linfócitos muito diminuídos, o que significa que não foi notada uma linfopénia marcada, contrariamente ao postulado por vários autores. Mais uma vez, a importância das diferentes alturas de apresentação à consulta deve ser salientada.

Por outro lado, e como já foi referido, no dia 2 do estudo não se registou linfopénia, apesar de esta estar presente nos dias 1 e 3. Após uma análise mais atenta dos dados, observa-se que ao dia 2 o valor individual máximo de linfócitos foi de 6876/ μ L. Este valor destaca-se dos demais máximos individuais, pois é o único dia em que ocorre uma linfocitose. É possível que esta singularidade seja responsável pela subida da contagem de linfócitos média e pela não ocorrência de linfopénia neste dia.

Os monócitos compõem em conjunto com os macrófagos o SMF. Apesar de a célula precursora ser comum a granulócitos maduros e a monócitos, o tempo de produção destes leucócitos é diferente. A produção de monócitos dura 3 dias enquanto que dos

neutrófilos leva 6 dias (Latimer, 1995; Latimer & Prasse, 1994; Bienzle, 2000). Isto implica que a recuperação do número de monócitos precede o reaparecimento de neutrófilos no sangue.

No nosso estudo não se registou monocitopénia nas contagens médias. No entanto, durante os primeiros 3 dias é notória a existência de animais com monocitopénia, apesar das contagens individuais não serem muito baixas ($72/\mu\text{L}$, $88/\mu\text{L}$ e $105/\mu\text{L}$, respectivamente).

Como a célula precursora é comum a monócitos e a neutrófilos, vários autores afirmaram que a monocitopénia seguida de contagens normais de monócitos ou de monocitose anuncia a recuperação da produção de neutrófilos (Latimer, 1995; Latimer & Prasse, 1994; Bienzle, 2000). No presente trabalho não se registou a ocorrência de monocitopénia nem de neutropénia. Não sendo possível o controlo sobre em que altura no curso da doença um animal é apresentado à consulta, pode admitir-se que a monocitopénia tenha ocorrido previamente ao internamento e já estivesse ultrapassada. Esta normalidade dos valores de monócitos médios prediz o restabelecimento dos neutrófilos. Assim, é plausível que tenha havido cachorros com monocitopénia e neutropénia que recuperaram as suas contagens de monócitos e posteriormente de neutrófilos.

Uma vez que não existe um compartimento de armazenamento medular para estes leucócitos, não há perda de monócitos com a lesão medular que ocorre na infecção por PVC-2. Assim sendo, a monocitopénia não constitui uma das alterações hematológicas expectável na gastroenterite a parvovírus, em oposição a outras alterações leucocitárias como a neutropénia.

A contagem de eosinófilos é muito influenciável por factores que podem não estar directamente relacionados com situações de doença, como estímulos ambientais e o exercício físico. Para além disto, muitos animais têm contagens de 0 eosinófilos/ μL , o que torna difícil a documentação de eosinopénia verdadeira e faz desta uma alteração com valor clínico muito limitado.

No nosso estudo observou-se eosinopénia nas contagens médias dos dias 2, 4 e 5, sendo mais acentuada ao dia 2 ($43,13/\mu\text{L}$, $86,45/\mu\text{L}$ e $66,75/\mu\text{L}$, respectivamente). No dia 3 a contagem de eosinófilos média é bastante elevada quando comparada ao dia antecedente e aos dois dias precedentes. Isto poderá ser justificado pelo valor máximo individual registado nesse dia, que foi de 1184 eosinófilos/ μL , valor que certamente subiu a média e evitou que se registasse eosinopénia. De referir que este valor representa o maior

número individual de eosinófilos em todos os dias do estudo. Alguns autores reportaram a ocorrência de eosinopénia em cães infectados com PVC-2 (Goddard *et al.*, 2008; Frazão, 2008). Apesar disto, no presente estudo o mínimo diário individual foi sempre de 0/ μ L, factor que naturalmente influencia as contagens médias.

Como é sabido, as contagens absolutas de neutrófilos não segmentados e basófilos são muito reduzidas em condições normais (0-300/ μ L para os neutrófilos não segmentados e raros basófilos) e neste estudo isso não foi excepção. O estudo das alterações das contagens de basófilos e neutrófilos não segmentados não foi conclusivo. Os neutrófilos não segmentados possuem um intervalo de referência de 0-300/ μ L. Apenas ao primeiro dia do estudo esse valor foi diferente de 0, alcançando uma média de 17,38/ μ L, valor que se compreende dentro dos de referência. Observou-se uma situação semelhante para os basófilos. Segundo os intervalos de referência adoptados neste trabalho, estes leucócitos são de observação rara, não sendo avançado um valor numérico para o dito intervalo. Não obstante, as contagens de basófilos foram sempre de 0/ μ L, para todos os animais e em todos os dias do estudo.

Posto isto, pode afirmar-se que a infecção por parvovírus não afecta directamente estes tipos de leucócitos. Num estudo realizado em 2008 por Goddard e colegas constatou-se que os animais que sobreviveram à gastroenterite por PVC-2 apresentaram um desvio à esquerda degenerativo, alteração não existente no grupo de não sobreviventes. Esta observação não é concordante com o nosso trabalho, uma vez que nenhum dos animais em estudo (sobrevivente ou não) apresentou em qualquer altura desvio à esquerda.

Neste trabalho os parâmetros eritrocitários estudados não apresentaram alterações nas contagens médias. Os resultados obtidos para estes índices e para as plaquetas encontram-se no Anexo I. Num estudo realizado por Frazão em 2008 constatou-se uma ligeira diminuição do hematócrito, situação que foi atribuída à combinação da hemorragia intestinal produzida pela lesão entérica do vírus e o efeito de diluição da fluidoterapia. Outros autores mencionam a ocorrência de anemia hemorrágica, frequentemente associada a parasitose interna concomitante, a qual se pode manifestar como anemia com pan-hipoproteinémia (Macintire & Smith-Carr, 1997). Em 2010 Kalli *et al.* observaram a existência de 14% de animais anémicos no seu estudo sobre duração de hospitalização na parvovirose. A infecção por parvovírus pode causar anemia aplásica aguda como consequência da lesão de células progenitoras e proliferativas. No

entanto, não se pode eliminar a possibilidade de existência de lesão medular originada por septicémia ou por endotoxinémia secundária (Weiss, 2000).

Não obstante estas observações, a anemia não é uma alteração hematológica típica na gastroenterite por PVC-2, uma vez que os eritrócitos maduros possuem uma longa semi-vida comparada com o período durante o qual o vírus induz mielosupressão (Potgieter *et al.*, 1981).

Na avaliação da contagem média de plaquetas observou-se que em todos os dias ocorreu trombocitopénia, à excepção do dia 1. Frazão em 2008 já teria encontrado trombocitopénia em 58,6% dos animais, porém não foi observada diferença significativa entre os grupos de alta e de óbito. Noutro trabalho de Kalli *et al.* de 2010 foram encontrados animais com trombocitopénia ou com trombocitose (8% e 32%, respectivamente). Num estudo do ano 2000 cujo intuito foi avaliar estado de hipercoaguabilidade em animais com infecção por PVC-2, todos os animais possuíam contagens plaquetárias dentro do intervalo de referência (Otto & Mantione, 2000).

Deve mencionar-se ainda que no presente estudo, mesmo nos animais com contagens plaquetárias reduzidas, os sinais clínicos associados a trombocitopénia estiveram ausentes.

No trabalho realizado por Frazão em 2008, concluiu-se que é possível estabelecer um prognóstico fiável a partir do hemograma efectuado no dia de apresentação através da contagem total de leucócitos e do número absoluto de linfócitos e eosinófilos. Num outro estudo de 2008 por Goddard *et al.* as conclusões encontradas foram concordantes, excepto para os monócitos e os neutrófilos não segmentados, os quais foram relevantes neste mesmo trabalho.

No presente estudo as alterações mais profundas foram encontradas para a contagem total de leucócitos e para o número absoluto de linfócitos e eosinófilos. Apesar de haver algumas diferenças entre os trabalhos supracitados e o presente estudo, as alterações mais evidentes foram semelhantes. No nosso trabalho, como no de Frazão, os neutrófilos não segmentados e os monócitos não pareceram ser afectados, contrariamente às observações feitas por Goddard *et al.*

Nos últimos anos têm surgido estudos que sugerem outros factores de prognóstico que não o leucograma para a infecção por parvovírus canino. Num trabalho datado do ano 2007 realizado por Schoeman, Goddard e Herrtage foi avaliada a fiabilidade dos níveis serológicos de cortisol basal. Estes autores concluíram que a combinação de elevados

níveis serológicos de cortisol com níveis diminuídos de tiroxina às 24 e 48 horas após a apresentação do animal estão associados com a sua morte. Estas conclusões sugerem que os pacientes infectados por PVC-2 que não sobrevivem possuem níveis elevados de cortisol, situação que pode também originar a eosinopenia encontrada no nosso estudo. Os níveis de colesterol sérico total e de HDL também surgiram como parâmetros para avaliação da gravidade do estado clínico e, conseqüentemente, do prognóstico (Yilmaz & Senturk, 2007). Um trabalho realizado em 2010 por Kocaturk, Martinez, Eralp, Tvarijonaviciute, Ceron e Yilmaz com o objectivo de avaliar o valor de prognóstico de proteínas de fase aguda na parvovirose canina, concluiu-se que a magnitude do aumento das proteínas de fase aguda serve de bom indicador de prognóstico nesta doença e que a proteína C reactiva é um bom factor de predição de mortalidade. Contudo, em comparação com o leucograma, todos os parâmetros descritos implicam um gasto monetário superior e são obtidos através de provas laboratoriais mais complexas, as quais são realizadas em laboratórios externos e que geralmente não podem ser praticadas na maioria dos estabelecimentos de prática veterinária. Assim sendo, pela sua acessibilidade e boa fiabilidade, o leucograma continua a revestir-se de grande importância para os médicos veterinários assistentes na prática clínica comum.

Originalmente, o presente estudo pretendia dar continuidade ao trabalho iniciado em 2008 por Frazão. O objectivo foi tentar incluir os sinais clínicos como o vômito e a diarreia descritos para ajustar o leucograma como critério de prognóstico na parvovirose canina. Com esta combinação desejava-se elaborar uma escala de prognóstico que pudesse ser útil na prática clínica. Vários factores influenciaram o curso deste trabalho e impossibilitaram uma realização fiel ao projecto inicial. Apesar de o período de recolha de dados ser relativamente extenso, apenas se reuniram 28 casos que cumpriam os critérios de inclusão. Assim sendo, a dimensão da amostra constituiu um obstáculo relevante. A somar a este factor, o decurso e duração da doença é própria de cada animal, o que faz com que nos tenhamos deparado com uma grande heterogeneidade de dados. Pretendeu-se estabelecer um padrão de reacção temporal que permitisse avaliar de forma correcta a cinética leucocitária. Assim, os presentes resultados sugerem que a contagem total de leucócitos está reduzida do dia 2 a 4, que a contagem absoluta de linfócitos está diminuída aos dias 1 e 3 e que a contagem absoluta de eosinófilos decresce nos dias 2, 4 e 5, mostrando para todos os tipos de leucócitos tendência para a recuperação e regresso a valores compreendidos pelos de referência.

6 CONCLUSÕES

A gastroenterite por parvovírus é uma doença altamente infecciosa com expressão a nível mundial, havendo em circulação várias estirpes. Independentemente da estirpe infectante, esta doença tem uma morbilidade e mortalidade consideráveis. Assim sendo, o conhecimento da fisiopatologia e dos efeitos consequentes é fulcral, auxiliando na avaliação da gravidade dos quadros clínicos.

A taxa de mortalidade do estudo foi semelhante à descrita na literatura consultada.

As raças mais representadas no presente estudo não são inteiramente concordantes com as previamente descritas como mais susceptíveis à infecção. Esta situação pode espelhar a diferença entre a população canina nacional e as populações dos países onde foram feitos esses trabalhos. A representatividade da raça Epagneul Bretão traduz uma caracterização da população do local de realização deste trabalho e as raças Perdigueiro Português e Rafeiro Alentejano aparecem como representantes nacionais.

Não foi encontrada associação entre o sexo e o desfecho. No que diz respeito à idade, os resultados obtidos apresentam uma maior frequência da faixa etária entre os 2 e os 6 meses, com maior representatividade da faixa dos 2 aos 5 meses, o que enfatiza a importância da vacinação e das medidas de biossegurança.

A maioria dos casos ocorreu entre Setembro a Novembro, o que é explicado pelo clima do nosso país.

A duração de hospitalização média foi de 4,59 dias, a qual está associada à regeneração dos tecidos mais afectados no decurso da doença.

Foram encontradas alterações na contagem total média de leucócitos e nas contagens absolutas médias de linfócitos e eosinófilos. Estas alterações não se manifestaram simultaneamente, porém pode admitir-se que os dias 1 a 5 de doença são os mais preocupantes, uma vez que os animais estão mais susceptíveis à ocorrência de complicações como sépsis ou endotoxémia.

7 BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A.K. & Lichtman, A.H. (2005). Immunity to microbes. In W.K. Schmitt & H. Krehling, (Eds.), *Cellular and Molecular Immunology*. (5th Ed.). (pp.355-359). Elsevier Saunders.
- Agbandje, M., Parrish, C.R. & Rossmann, M.G. (1995). The recognition of parvovirus capsides by antibodies. *Seminars in Virology*, 6, 219-231.
- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical Care Medicine*, 20, 864-874.
- Anthony, H.M. (1982). Blood basophils in lung cancer. *British Journal of Cancer*, 45, 209-216.
- Appel, M.J.G. (1969). Pathogenesis of canine distemper. *American Journal of Veterinary Research*, 30, 1167-1181.
- Appel, M.J.G., Cooper, B.J., Greisen, H. & Carmichael, L.E. (1978). Status report: canine viral enteritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 173(11), 1516-1518.
- Babiuk, L.A., Hurk, S. & Tikoo, S.K. (1996). Immunology of herpesvirus 1 infection. *Veterinary Microbiology*, 53, 31-42.
- Barsanti, J.A. & Finco, D.R. (1984). Evaluation of techniques for diagnosis of canine prostatic diseases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185, 198-200.
- Battilani, M., Gallina, L., Vaccari, F. & Morganti, L. (2007). Co-infection with multiple variants of canine parvovirus type 2 (CPV-2). *Veterinary Research Communications*, 31 (1), 209-212.
- Beeson, P.B. (1983). Cancer and eosinophilia. *New England Journal of Medicine*, 309, 792-793.
- Berns, K. & Parrish, C.R. (2007). Parvoviridae. In D.M. Knipe & P.M. Howley (Eds-in-Chief), *Field's Virology – volume two*. (pp.2437-2463). Philadelphia, USA: Lippincott William & Wilkins – Wolters Kluwer Health.
- Bienzele, D. (2000). Monocytes and Macrophages. In: B.F. Feldman, J.G. Zinkl & N.C. Jain (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. (5th Ed.). (pp.318-325). Baltimore, Maryland, U.S.A.: Lippincott William & Wilkins.
- Boosinger, T.R., Rebar, A.H, DeNicola, D.B. & Boon, G.D. (1982). Bone marrow alterations associated with canine parvoviral enteritis. *Veterinary Pathology*, 19 (5), 558-561.
- Brown, R.M. & Rogers, K.S. (2001). Neutropenia in dogs and cats. *Compendium of Continuous Education for the Practicing Veterinarian*, 23(6), 534-543.

- Brunner, C.J. & Swango, L.J. (1985). Canine parvovirus infection: effects on the immune system and factors that predispose to severe disease. *Compendium of Continuous Education for the Practicing Veterinarian*, 7 (12), 979-989.
- Buonavoglia, D., Cavalli, A., Pratelli, A., Martella, V., Greco, G., Tempesta, M. & Buonavoglia, C. (2000). Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *New Microbiologica*, 23, 93-96.
- Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N. & Carmichael, L. (2001). Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *Journal of General Virology*, 82, 3021-3025.
- Burek, K.A., Gulland, F.M.D., Sheffield, G., Beckmen, K.B., Keyes, E., Spraker, T.R., Smith, A.W., Skilling, D.E., Evermann, J.F., Stott, J.L., Saliki, J.T. & Trites, A.W. (2005). Infectious disease and the decline of steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) in Alaska, USA: Insights from serologic data. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(3), 512-524.
- Butterworth, A.E. & David, J.R. (1981). Eosinophil function. *New England Journal of Medicine*, 304, 429-433.
- Capron, M., Tomassini, M., Torpier, G., Kusnierz, J.P., MacDonald, S. & Capron, A. (1989). Selectivity of mediators released by eosinophils. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 88, 54-58.
- Costa, P.R.S., Conceição, L.G. & Lopes, M.A.F. (2009). Nutrição enteral precoce com glutamina em cães com gastroenterite hemorrágica pelo parvovírus canino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61 (5).
- Cotmore, S.F. & Tattersall, P. (1987). The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Advances in Virus Research*, 33, 91-174.
- Cubeddu, L.X., Hoffman, I.S., Fuenmayor, N.T. & Finn, A.L. (1990). Efficacy of ondasetron and the role of serotonin in cisplatin-induced nausea and vomiting. *The New England Journal of Medicine*, 322 (12), 810-816.
- Dale, D.C., Hubert, R.T. & Fauci, A.S. (1976). Eosinophil kinetics in the hypereosinophilic syndrome. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 87, 487-495.
- Day, M.J. (1999). Basic Immunology. In: M.J. Day (Ed.), *Clinical Immunology of the Dog and Cat*. (pp. 9-43). Manson Publishing.
- De la Puente-Redondo, V.A., Tilt, N., Rowan, T.G. & Clemence, R.G. (2007a). Efficacy of maropitant for treatment and prevention of emesis caused by intravenous infusion of cisplatin in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 68 (1), 48-56.
- De la Puente-Redondo, V.A., Siedek, E. M., Banchaoui, H.A., Tilt, N., Rowan, T.G. & Clemence, R.G. (2007b). The anti-emetic efficacy of maropitant (Cerenia™) in

the treatment of ongoing emesis caused by a wide range of underlying clinical aetiologies in canine patients in Europe. *Journal of Small Animal Practice*, 48 (2), 93-98.

- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Desario, C., Campolo, M., Di Trani, L., Tarsitano, E., Tempesta, M. & Buonavoglia, C. (2005). A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Veterinary Microbiology*, 105, 19-28.
- Decaro, N., Elia, G., Desario, C., Roperto, S., Martella, V., Campolo, M., Lorusso, A., Cavalli, A. & Buonavoglia, C. (2006a). A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *Journal of Virological Methods*, 136, 65-70.
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Campolo, M., Desario, C., Camero, M., Cirone, F., Lorusso, E., Lucente, M.S., Narcisi, D., Scalia, P. & Buonavoglia, C. (2006b). Characterization of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove bonding probe technology. *Journal of Virological Methods*, 133, 92-99.
- Decaro, N., Martella, V., Elia, G., Desario, C., Campolo, M., Buonavoglia, D., Bellacicco, A.L., Tempesta, M. & Buonavoglia, C. (2006c). Diagnostic tools based on minor groove binder probe technology for rapid identification of vaccinal and field strains of canine parvovirus type 2b. *Journal of Virological Methods*, 138, 10-16.
- Decaro, N., Martella, V., Desario, C., Bellacicco, A.L., Camero, M., Manna, L., D'Aloja, D. & Buonavoglia, C. (2006d). First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *Journal of Veterinary Medicine*, 53, 468-472.
- Decaro, N., Desario, C., Addie, D. D., Martella, V., Vieira, M. J., Elia, G., Zicola, A., Davis, C., Thompson, G., Thiry, E., Truyen, U. & Buonavoglia, C. (2007a). Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 1222-1224.
- Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Campolo, M., Lorusso, A., Mari, V., Martella, V. & Buonavoglia, C. (2007b). Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine*, 25, 1161-1166.
- Decaro, N., Martella, V., Elia, G., Desario, C., Campolo, M., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Lorusso, A. & Buonavoglia, C. (2007c). Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2c in dogs. *Veterinary Microbiology*, 121, 39-44.
- Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Mari, V., Lavazza, A., Nardi, M. & Buonavoglia, C. (2008a). Evidence for immunization failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiologica*, 31, 125-130.
- Decaro, N., Desario, C., Miccolupo, A., Campolo, M., Parisi, A., Martella, V., Amorisco, F., Lucente, M.S., Lavazza, A. & Buonavoglia, C. (2008b). Genetic

- analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis. *Journal of General Virology*, 89, 2290-2298.
- Decaro, N., Desario, C., Parisi, A., Martella, V., Lorusso, A., Miccolupo, A., Mari, V., Colaianni, M.L., Cavalli, A., Trani, T. & Buonavoglia, C. (2009a). Genetic analysis of parvovirus type 2c. *Virology*, 385, 5-10.
- Decaro, N., Cirone, F., Desario, C., Elia, G., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Martella, V. & Buonavoglia, C. (2009b). Severe parvovirus in a 12-year-old dog that had been repeatedly vaccinated. *Veterinary Record*, 164, 593-595.
- Decaro, N., Desario, C., Billi, M., Mari, V., Elia, G., Cavalli, A., Martella, V. & Buonavoglia, C. (2009c). Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. *The Veterinary Journal*. Acedido em Jun. 11, 2010, disponível em [http:// 10.1016/j.tvjl.2009.10.027](http://10.1016/j.tvjl.2009.10.027).
- Decaro, N., Desario, C., Beall, M.J., Cavalli, A., Campollo, M., DiMarco, A.A., Amorisco, F., Colaianni, M.L. & Buonavoglia, C. (2010). Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house test. *The Veterinary Journal*, 184, 373-375.
- Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Camero, M. & Buonavoglia, C. (2005). Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *Journal of Virological Methods*, 126, 179-185.
- Deubeleiss, K.A., Dancey, J.T., Harker, L.A. & Finch, C.A. (1975). Neutrophil kinetics in the dog. *Journal of Clinical Investigation*, 55, 833-839.
- Diamond, R.D., Krzesicki, R., Epstein, B. & Wellington, J. (1978). Damage to hyphal forms of fungi by human leukocytes in vitro. A possible host defense in aspergillosis and mucormycosis. *American Journal of Pathology*, 313-328.
- Di Bartola, S.P. & Autran de Morais, H.S. (1992). Disorders of potassium: Hypokalemia and hyperkalemia. In S.P. Di Bartola (Ed.), *Fluid therapy in Small Animal Practice*. (pp.89-115). Philadelphia, U.S.A.: WB Saunders Company.
- Driciru, M., Siefert, L., Prager, K.C., Dubovi, E., Sande, R., Princee, F., Friday, T. & Munson, L. (2006). A serosurvey of viral infections in lions (*Panthera leo*), from Queen Elizabeth National Park, Uganda. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(3), 667-671.
- Duffy, A., Dow, S., Ogilvie, G., Rao, S. & Hackett, T. (2009). Hematologic improvement in dogs with parvovirus infection treated with recombinant canine granulocyte-colony stimulating factor. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 33, 352-356.
- Dvorak, A.M. & Dvorak, H.F. (1979). The basophil: its morphology, biochemistry, motility, release reactions, recovery and role in the inflammatory responses of Ig-E mediated and cell-mediated origin. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 103, 551-557.

- Earl, F.L., Melveger, B.E. & Wilson, R.L. (1973). The hemogram and bone marrow profile of normal neonatal and weanling beagle dogs. *Laboratory Animal Science*, 23, 690-695.
- Esfandiari, J. & Klingeborn, B. (2000). A comparative study of a new rapid and one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink. *Journal of Veterinary Medicine B*, 47, 145-153.
- Fittschen, C., Parmley, R.T. & Austin, R.L. (1988). Ultrastructural cytochemistry of complex carbohydrates in developing feline neutrophils. *American Journal of Anatomy*, 181, 195-202.
- Florent, G. (1986). Enzyme-linked immunosorbent assay for single serum diagnosis of canine parvovirus disease. *Veterinary Record*, 119, 479-480.
- Frazão, P.S.G.S. (2008). *Alterações leucocitárias como factor de prognóstico na evolução clínica da parvovirose canina: 191 casos*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Gamble, D.A., Lobbiani, A., Gramegna, M. Moore, L.E. & Colucci, G. (1997). Development of a nested PCR assay for detection of feline infectious peritonitis virus in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (3), 673–675.
- Gaunt, P.S., Gaunt, S.D. & Craig, T.M. (1983). Extreme neutrophilic leukocytosis in a dog with hepatozoonosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 182, 409-410.
- Glickman, L.T., Domanski, L.M., Patronek, G.J. & Visintainer, F. (1985). Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 187, 589-594.
- Goddard, A., Leisewitz, A.L., Christopher, M.M., Duncan, N.M. & Becker, P.J. (2008). Prognostic usefulness of blood leukocyte changes in canine parvoviral enteritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 309-316.
- Gombac, M., Svara, T., Tadic, M. & Pogacnik, M. (2008). Retrospective study of canine parvovirus in Slovenia. *Slovenian Veterinary Research*, 45 (2), 73-78.
- Gordon, J.C. & Angrick, E.J. (1988). Canine parvovirus: environmental effects on infectivity. *American Journal of Veterinary Research*, 147, 1464-1467.
- Gossett, K.A., MacWilliams, P.S., Enright, F.M., Cleghorn, B. (1983). In vitro function of canine neutrophils during experimental inflammatory disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 5, 151-159.
- Greenwood, N.M., Chalmers, W.S.K., Baxendale, W. & Thompson, H. (1996). Comparison of isolated of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme analysis. *Veterinary Record*, 138, 495-496.
- Griwdem, C.B. (1989). Bone marrow biopsy and evaluation. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 19, 669-696.

- Hall, E.J. & German, A.J. (2005). Diseases of the small intestine. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (6th Ed.). (pp. 1333-1378). Philadelphia, USA. : W.B. Saunders Company.
- Halliwell, R.E.W. & Schemmer, K.R. (1987). The role of basophils in the immunopathogenesis of hypersensitivity to fleas (*Ctenocephalides felis*) in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 15, 203-213.
- Harrison, L.R., Styer, E.L., Pursell, A.R., Carmichael, L.E. & Nietfield, J.C. (1992). Fatal disease in nursing puppies associated with minute virus of canines. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4, 19-22
- Hirsh, C.D., Jang, S.S. & Biberstein, D.L. (1984). Blood culture of the canine patient. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 184, 175-178.
- Homem, V.S.F., Mendes, Y.G. & Linhares, A.C. (1999). Gastroenterite canina – agentes virais nas fezes de cães diarreicos e não diarreicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 51 (6).
- Hong, C., Decaro, N., Desario, C., Tanner, P., Pardo, M.C., Sanchez, S., Buonavoglia, C. & Saliki, J.T. (2007). Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 535-539.
- House, B.T., Babiuk, L.A. & Henson, P.M. (1980). Neutrophils in antiviral immunity: inhibition of virus replication by a mediator produced by bovine neutrophils. *Journal of Infectious Diseases*, 141, 223-232.
- Houston, D.M., Ribble, C.S. & Head, L.L. (1996). Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208, 542-546.
- Hudson, G. (1968). Quantitative study of the eosinophil granulocytes. *Seminars in Hematology*, 5, 166-186.
- Hueffer, K., Parker, J.S.L., Weichert, W., Geisel, R.E., Srgo, J.Y. & Parrish, C.R. (2003). The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferring receptor. *Journal of Virology*, 77, 1718-1726.
- Huntley, J.F. (1992). Mast cells and basophils: a review of their heterogeneity and function. *Journal of Comparative Pathology*, 107, 349-372.
- Isogai, E., Isogai, H., Onuma, M., Mizukoshi, N., Hayashi, M. & Namioka, S. (1989). Escherichia coli associated endotoxemia in dogs with parvovirus infection. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 51 (3), 597-606.
- Jain, N.C. (1986). The Eosinophils. In N.C. Jain (Ed.), *Schalm's Veterinary Hematology*. (4th Ed.). (pp. 731-755). Philadelphia, U.S.A.: Lea & Febiger.
- Jain, N.C. (1986). The Neutrophils. In N.C. Jain (Ed.), *Schalm's Veterinary Hematology*. (4th Ed.). (pp. 676-730). Philadelphia, U.S.A.: Lea & Febiger.

- Jain, N.C. (1993). *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia, U.S.A.: Lea & Febiger.
- Jasper, D.E. & Jain, N.C. (1964). Postprandial lipemia in dogs. *California Veterinary*, 18, 27.
- Kalli, I., Leontides, L.S., Mylonakis, M.E., Adamama-Moraitou, K., Rallis, T. & Koutinas, A.F. (2010). Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. *Research in Veterinary Science*, 89, 174-178.
- Kapil, S., Cooper, E., Lamm, C., Murray, B., Rezabek, G., Johnston 3rd, L., Campbell, G. & Johnson, B. (2007). Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in north american dogs: 2006-2007. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 4044-4047.
- Kariuki, N.M., Nyaga, P.N., Buoro, I.B.J et al. (1990). Effectiveness of fluids and antibiotics as supportive therapy of canine parvovirus-2 enteritis in puppies. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 38, 379-389.
- Kennedy, M.A., Mellon, V.S., Caldwell, G. & Potgieter, L.N.D. (1995). Virucidal efficacy of the newer quaternary ammonium compounds. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 31, 254-258.
- Kim, S.K. & Demetri, G.D. (1996). Chemotherapy and neutropenia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 10, 377-395.
- Kocaturk, M., Martinez, S., Eralp, O., Tvarijonaviciute, A., Ceron, J. & Yilmaz, Z. (2010). Prognostic value of serum acute-phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of Small Animal Practice*, 51 (9), 478-483.
- Kociba, G. (2000). Leukocytes changes in disease. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and the cat*. (5th Ed.). (pp1842-1857). Philadelphia, U.S.A.: WB Saunders Company.
- Kramer, J.M., Meunier, P. & Pollock, R. (1980). Canine parvovirus: Update. *Veterinary Medicine, Small Animals Clinician*, 75(10), 1541-1555.
- Lamm, C.G. & Rezabek, G.B. (2008). Parvovirus infection in domestic companion animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38, 837-850.
- Latimer, K.S. & Rakich, P.M. (1989). Clinical interpretation of leukocyte responses. *Veterinary Clinic North American Small Animal Practice*, 19, 637-668.
- Latimer, K.S. & Prasse, K.W. (1994). Leukocytes. In R.J. Duncan, K.W. Prasse & E.A. Mahaffey (Eds.), *Veterinary Laboratory Medicine; Clinical Pathology*. (3rd Ed.). Ames, Iowa, U.S.A.: Iowa State Press.
- Latimer, K.S. (1995). Leukocytes in health and disease. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat*. (4th Ed.). (pp.1892-1946). Philadelphia, U.S.A.: WB Saunders Company.

- Lee, G.R., Bithell, T.C., Foester, J., Athens, J.W., Leukens, J.N, Kushner, J. (Eds.). (1993). *Wintrobe's Clinical Hematology*. (9th Ed.). Philadelphia, U.S.A.: Lea & Febiger.
- Macintire, D.K. & Smith-Carr, S. (1997). Canine parvovirus. Part II. Clinical signs, diagnosis and treatment. *The Compendium on Continuing Education*, 19 (3).
- Macartney, L., McCandlish, I.A., Thompson, H. & Cornwell, H.J. (1984). Canine parvovirus enteritis 1: Clinical, haematological and pathological features of experimental infection. *Veterinary Record*, 115, 201-210.
- Mann, P.C., Bush, M., Appel, M.J.G., Beehler, B.A. & Montali, R.J. (1980). Canine parvovirus infection in south American canids. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 177 (9), 779-783.
- Mantione, N.L. & Otto, C.M. (2005). Characterization of the use of antiemetic agents in dogs with parvoviral enteritis treated at a veterinary teaching hospital: 77 cases (1997-2000). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 227 (11), 1787-1793.
- Martella, V., Cavalli, A., Pratelli, A., Bozzo, G., Camero, M., Buonavoglia, D., Narcisi, D., Tempesta, M. & Buonavoglia, C. (2004). A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (3), 1333-1336.
- Martella, V., Decaro, N., Elia, G. & Buonavoglia, C. (2005). Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *Journal of Veterinary Medicine B*, 52, 312-315.
- Martella, V., Decaro, N. & Buonavoglia, C. (2006). Evolution of CPV-2 and impliceance for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes*, 33, 11-13.
- May, M.E. & Waddell, C.C. (1984). Basophil in peripheral blood and bone marrow: a retrospective review. *The American Journal of Medicine*, 76, 509-511.
- McCaw, D.L. & Hoskins, J.D. (2006). Canine Viral Enteritis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (3rd Ed.). (pp.63-70). Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.: Saunders Elsevier.
- Meinkoth, J.H. & Clinkenbeard, K.D. (2000) Normal hematology of the dog. In B.F. Feldman, J.G. Zinkl & N.C. Jain (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. (5th Ed.). (pp.1057-1063). Baltimore, Maryland, U.S.A.: Lippincott William & Wilkins.
- Meissonnier, E. & Bourdin, M. (1992). Contrôle de la parvovirose dans une collectivité de chiens beagle. *Le Point Vétérinaire*, 24 (145), 275-280.
- Meunier, P.C., Cooper, B.J., Appel, M.J.G., Lanieu, M. E. & Slauson, D. O. (1985). Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies. *Veterinary Pathology*, 22, 617-624.
- Merial Portuguesa Saúde Animal, LDA (2007). *Animais de Companhia – Guia Prático para trabalhos de consultório*. (pp.78).

- Mims, C., Nash, A. & Stephen, J. (2001). Mechanisms of Cell and Tissue damage. In C. Mims, A. Nash, & J. Stephen (Eds.), *Mims' Pathogenesis of Infectious Disease*. (5th Ed.). (pp. 294-303). Cornwall, U.K.: MPG Books Ltd.
- Mischke, R., Barth, T., Wohlsein, P., Rohn, K. & Nolte, I. (2001). Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on leukocyte count and survival rate of dogs with parvoviral enteritis. *Research in Veterinary Science*, 70, 221-225.
- Mitema, E.S. (1985). Cytologic response of dog to weekly bone marrow collections. *Veterinarni Medicina*, 80, 37-38.
- Mochizuki, M., Harasawa, R. & Nakatani, H. (1993a). Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Veterinary Microbiology*, 38, 1-10.
- Mochizuki, M., San Gabriel, M.V., Nakatani, H., Yoshida, M. & Harasawa, R. (1993b). Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation, haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Research Veterinary Science*, 55, 60-63.
- Moore, P.F. & Bender, H.S. (2000). Neutropenia. In B.F. Feldman, J.G. Zinkl & N.C. Jain (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. (5th Ed.). (pp.350-355). Baltimore, Maryland, U.S.A.: Lippincott William & Wilkins.
- Nakamura, M., Tohya, Y., Miyazawa, T., Mochizuki, M., Phung, H. T. T., Nguyen, N. H., Huynh, L. M. T., Nguyen, L. T., Nguyen, P. N. & Nguyen, P. V. (2004) A novel antigenic variant of canine parvovirus from a vietnamese dog. *Archives of Virology*, 149, 2261-2269.
- Nara, P.L., Winters, K., Rice, J.B., Olsen, R.G. & Krakowka, S. (1983). Systemic and local intestinal antibody response in dogs given both infective and inactivated canine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, 44, 1989-1995.
- Nelson, D.T., Eustis, S.L., McAdaragh, J.P. & Stotz, I. (1979). Lesions of spontaneous canine viral enteritis. *Veterinary Pathology*, 16, 680-686.
- Newball, H.H., Meier, H.L. & Lichtenstein, L.M. (1980). Basophil mediators and their release, with emphasis on BK-A. *Journal of Investigative Dermatology*, 74, 344-348.
- Nguyen, S.V., Umeda, K., Yokoyama, H., Tohya, Y. & Kodama, Y. (2006). Passive protection of dogs against clinical disease due to canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 70(1), 62-64.
- Osterhaus, A.D.M.E., Drost, G.A., Wirahadiredja, R.M.S. & van den Ingh, S.G.A.M. (1980). Canine viral enteritis: prevalence of parvo-, corona- and rotavirus infections in dogs in the Netherlands. *The Veterinary Quarterly*, 2(4), 181-190.

- Otto, C.M., Drobatz, J.K. & Soter, C. (1997). Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occurring parvoviral enteritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11 (2), 65-70.
- Otto, C.M., Rieser, T.M., Brooks, M.B. & Russell, M.W. (2000). Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 217 (10), 1500-1504.
- O'Donnell, R.T. & Andersen, B.R. (1982). Characterization of canine neutrophil granules. *Infection and Immunity*, 38, 351-359.
- Parker, J.S.L., Murphy, W.J., Wang, D., O'Brien, S.J. & Parrish, C.R. (2001). Canine and feline parvovirus can use human or feline transferring receptors to bind, enter and infect cells. *Journal of Virology*, 75, 3896-3902.
- Parrish, C.R., O'Connell, P.H., Evermann, J.F. & Carmichael, L.E. (1985). Natural variation of canine parvovirus. *Science*, 230, 1046-1048.
- Parrish, C.R., Have, P., Foreyt, W.J., Evermann, J.F., Senda, M. & Carmichael, L.E. (1988). The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *Journal of General Virology*, 69, 1111-1116.
- Parrish, C.R., Aquadro, C.F., Strassheim, M.L., Evermann, J.F., Srgo, J.-Y. & Mohammed, H.O. (1991). Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *Journal of Virology*, 65, 6544-6552.
- Penny, R.H.C. & Carlisle, C.H. (1970). The bone marrow of the dog: a comparative study of biopsy material obtained from the iliac crest, rib and sternum. *Journal of Small Animal Practice*, 11, 727-734.
- Pereira, C.A., Monezi, T.A., Mehnert, D.U., D'Angelo, M. & Durigon, E.L. (2000). Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Veterinary Microbiology*, 75, 127- 133.
- Pérez, R., Francia, L., Romero, V., Maya, L., López, I. & Hernández, M. (2007). First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Veterinary Microbiology*, 124, 147-152.
- Pletcher, J.M., Toft, J.D., Frey, R.M. & Casey, H.W. (1979). Histopathologic evidence for parvovirus infection in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 175(8), 825-829.
- Pollock, R.V.H. & Coyne M.J. (1993). Canine parvovirus. *Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice*, 23, 555-568.
- Potgieter, L.N.D., Jones, J.B., Patton, C.S. & Webb-Martin, T.A. (1981). Experimental parvovirus infection in dogs. *Canadian Journal of Medicine*, 45, 212-216.
- Pratelli, A., Tempesta, M., Greco, G., Martella, V. & Buonavoglia, C. (1999). Development of a nested PCR assay for the detection of canine coronavirus. *Journal of Virological Methods*, 80 (1), 11-15.

- Pratelli, A., Cavalli, A., Martella, V., Tempesta, M., Decaro, N., Carmichael, L.E. & Buonavoglia, C. (2001). Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV-2 or CPV-2b modified live virus vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8 (3), 612-615.
- Prittie, J. (2004). Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 14 (3), 167–176.
- Ramsey, D.S., Kinkaid, K., Watkins, J.A., Boucher, J.F., Conder, G.A., Eagleson, J.S. & Clemence, R.G. (2008). Safety and efficacy of injectable and oral maropitant, a selective neurokinin₁ receptor antagonist, in a randomized clinical trial for treatment of vomiting in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 31 (6), 538-543.
- Reed, A.P., Jones, E.V. & Miller, T.J. (1988). Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *Journal of Virology*, 62, 266-276.
- Rekers, P.E. & Coulter, M. (1948). A hematological and histological study of the bone marrow and peripheral blood of the adult dog. *The American Journal of Medical Sciences*, 216, 643-655.
- Rewerts, J.M., McCaw, D.L., Cohn, L.A., Wagner-Mann, C. & Harrington, D. (1998). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor for treatment of puppies with neutropenia secondary to canine parvovirus infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 213, 991-992.
- Sagazio, P., Tempesta, M., Buonavoglia, D., Cirone, F. & Buonavoglia, C. (1998). Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy. *Journal of Virological Methods*, 73, 197-200.
- Sakulwira, K., Vanapongtipagorn, P., Theamboonlers, A., Oraveerakul, K. & Poovorawan, Y. (2003). Prevalence of canine coronavirus and parvovirus in dogs with gastroenteritis in Thailand. *Veterinary Medicine – Czech*, 48, 163-167.
- Salisbury, K.S., Lantz, G.C., Nelson, R.W. & Kazacos, E.A. (1988). Pancreatic abscess in dogs: six cases (1978-1986). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193, 1104-1108.
- Sandstedt, K. & Wienup, M. (1981). Concomitant occurrence of *Campylobacter* and parvoviruses in dogs with gastroenteritis. *Veterinary Research Communications*, 4, 271-273.
- Sedlacek, H.S., Ramsey, D.S., Boucher, J.F., Eagleson, J.S., Conder, G.A. & Clemence, R.G. (2008). Comparative efficacy of maropitant and selected drugs in preventing emesis induced by centrally or peripherally acting emetogens in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31(6), 533-537.
- Sellon, K.S. (2005). Canine Viral Diseases: Canine Parvovirus. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (5th Ed.). (pp.646-647). Philadelphia, U.S.A.: W.B. Saunders Company.

- Schoeman, J.P., Goddard, A. & Herrtage, M. E. (2007). Serum cortisol and thyroxine concentrations as predictors of death in critically ill puppies with parvoviral diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 231 (10), 1534-1539.
- Schultze, A.E. (2000). Interpretation of canine leukocyte response. In B.F. Feldman, J.G. Zinkl & N.C. Jain (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. (5th Ed.). (pp.366-379). Baltimore, Maryland, U.S.A.: Lippincott William & Wilkins.
- Smith, G.S. (2000). Neutrophils. In B.F. Feldman, J.G. Zinkl & N.C. Jain (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. (5th Ed.). (pp. 281-295). Baltimore, Maryland, U.S.A.: Lippincott William & Wilkins.
- Smith, G.S. & Lumsden, J.H. (1983). Review of neutrophil adherence, chemotaxis, phagocytosis and killing. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 4, 177-236.
- Smith-Carr, S., Macintire, D.K. & Swango, L.J. (1997). Canine parvovirus. Part I. Pathogenesis and vaccination. *The Compendium on Continuing Education*, 19 (2), 125-133.
- Steinel, A., Venter, E.H., Van Vuuren, M., Parrish, C.R. & Truyen, U. (1998). Antigenic and genetic analysis of canine parvovirus in southern Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 65, 239-242.
- Steinel, A., Munson, L., van Vuuren, M. & Truyen, U. (2000). Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *The Journal of General Virology*, 81(2), 345-50.
- Strassheim, M.L., Gruenberg, A., Veijalainen, P., Sgro, J.Y. & Parrish, C.R. (1994). Two dominant neutralizing antigen determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology*, 198, 175-184.
- Tennant, B. (2001). The Alimentary Tract. In I. Ramsey & B. Tennant (Eds.), *BSAVA. Manual of Canine and Feline Infectious Diseases*. (pp. 129-150). Lookers, Upton, Poole, Dorset, U.K.
- Tizard, I.R. (2000). Resistance to virus. In I.R. Tizard (Ed.), *Veterinary Immunology – An Introduction*. (6th Ed.). (pp. 267-274). W.B. Saunders Company.
- Tracey, K.J., Lowry, S.F., Fahey, T.J. 3rd, Albert, J.D., Fong, Y., Hesse, D., Beutler, B., Manogue, K.R., Calvano, S. & Wei, H. (1987). Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, 164(5), 415-422.
- Truyen, U. & Parrish, C.R. (1992). Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleucopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *Journal of Virology*, 66, 5399-5408.

- Truyen, U., Gruenberg, A., Chang, S.F., Obermaier, B., Veijalainen, P. & Parrish, C.R. (1995). Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *Journal of Virology*, 69, 4702-4710.
- Truyen, U., Platzer, G. & Parrish, C.R. (1996). Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Veterinary Record*, 138, 365-366.
- Truyen, U., Evermann, F., Vieler, E. & Parrish, C.R. (1996). Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology*, 215, 186-189.
- Truyen, U., Steinel, A., Bruckner, L., Lutz, H. & Mostl, K. (2000). Distribution of antigen types of canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 142, 115-119.
- Turk, J., Miller, M., Brown, T., Fales, W., Fischer, J., Gosser, H., Nelson, S., Shaw, D., Solorzano, R. (1990). Coliform septicemia and pulmonary disease associated with canine parvoviral enteritis: 88 cases (1987-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 196, 771-773.
- Turk, J., Fales, W., Miller, M., Pace, L., Fischer, J., Johnson, G., Kreeger, J., Turnquist, S., Pittman, L. & Rottinghaus, A. (1992). Enteric *Clostridium perfringens* infection associated with parvoviral enteritis in dogs: 74 cases (1987-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200, 991-994.
- Tvedten, H. (1994). Erythrocyte disorders. In M. Willard, H. Tvedten & G.H. Turnwald (Eds.), *Small animal clinical diagnosis by laboratory method*. (2nd Ed.). Philadelphia, U.S.A.: WB Saunders Company.
- Uchida, E., Ichijo, S., Goto, H., Nakajima, K. & Osame, S. (1988). Clinical, hematological and pathological findings in specific pathogen-free cats and conventional cats experimentally infected with canine parvovirus. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 50(3), 597-604.
- Uwatoko, K., Sunairi, M., Nakajima, M. & Yakamaura, K. (1995). Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in faeces of diarrheic dogs. *Veterinary Microbiology*, 43, 315-323.
- Valli, V.E. & Jacobs, R.M. (2000). Structure and function of the hemopoietic system. In B.F. Feldman, J.G. Zinkl & N.C. Jain (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. (5th Ed.). (pp.225-239). Baltimore, Maryland, U.S.A.: Lippincott William & Wilkins.
- Van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G. & Langevoort, N.L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophage, monocytes and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*, 46, 845-852.
- Vieira, M.J., Silva, E., Oliveira, J., Vieira, A.L., Decaro, N., Desario, C., Muller, A., Carvalheira, J., Buonavoglia, C. & Thompson, G. (2008). Canine parvovirus 2c infection in central Portugal. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28, 488-491.

- Waner, T., Mazar, S., Nachmias, E., Korn-Kornblatt, E. & Harrus, S. (2003). Evaluation of a dot ELISA kit for canine parvovirus and canine distemper virus immunoglobulin M antibodies. *Veterinary Record*, 152, 588-591.
- Waner, T., Keren-Kornblatt, E., Shemesh, O. & Mazar, S. (2004). Diagnosis of acute canine parvovirus infection (CPV-2) in naturally infected dogs using serum IgM and IgG rapid dot ELISA. *Israel Journal of Veterinary Medicine*.
- Wardlaw, A.J. & Kay, A.B. (1995). Eosinophils: production, biochemistry and function. In E. Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Coller, & T. Kipps (Eds.), *Williams Hematology*. (5th Ed.). (pp.798-805). New York, U.S.A. : McGraw & Hill.
- Washabau, R.J. & Elie, M.S. (1995). Antiemetic therapy. In R.W. Kirk (Ed.), *Current veterinary therapy XII*. (pp. 679-684). Philadelphia, U.S.A. : WB Saunders Company.
- Weeren, F.R. & Muir, W.W. (1992). Clinical aspects of septic shock and comprehensive approaches to treatment in dogs and cats. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 200, 1859-1866.
- Weiss, D.J. & Armstrong, P.J. (1984). Nonregenerative Anemias in the dog. *Compendium of Continuous Education for the Practicing Veterinarian*, 6, 452-460.
- Weiss, D.J. & Klausner, J.S. (1990). Drug-associated aplastic anemia in dogs: eight cases (1984-1988). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 196, 472-479.
- Weiss, D.J. (2000). Aplastic Anemia. In B.F. Feldman, J.G. Zinkl & N.C. Jain (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. (5th Ed.). (p.212). Baltimore, Maryland, U.S.A.: Lippincott William & Wilkins.
- Wessels, B.C. & Gaffin, S.L. (1986). Anti-endotoxin immunotherapy for canine parvovirus endotoxaemia. *Journal of Small Animal Practice*, 27 (10), 609-615.
- Williams, M.R. & Bunch, K.J. (1981). Variation among cows in the ability of their blood polymorphonuclear leukocytes to kill *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Research Veterinary Science*, 30, 298-302.
- Yamaguchi, T., Suda, T., Ohta, S., Tominaga, K., Miura, Y. & Kasahara, T. (1991). Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. *Blood*, 78, 2542-2547.
- Ybanez, R.R., Vela, C., Cortes, E., Simarro, I. & Casal, J.I. (1995). Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Veterinary Record*, 136, 174-175.
- Yilmaz, Z. & Senturk, S. (2007). Characterisation of lipid profiles in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of Small Animal Practice*, 48 (11), 643-650.

- Young, N. & Mortimer, P. (1984). Viruses and bone marrow failure. *Blood*, 63, 729-737.
- Young, K.M. (2000). Eosinophils. In B.F. Feldman, J.G. Zinkl & N.C. Jain (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. (5th Ed.). (pp.297-306). Baltimore, Maryland, U.S.A.: Lippincott William & Wilkins.

ANEXOS

ANEXO I

Tabela 1 – Resultados para o eritrograma, incluindo os valores mínimo e máximo, média e desvio padrão diários.

		Nº de casos (n)	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	Dia 1	28	3,79	8,82	6,25	1,30
	Dia 2	19	3,16	8,75	5,75	1,43
	Dia 3	19	3,42	9,04	5,82	1,35
	Dia 4	13	3,54	6,84	5,70	0,97
	Dia 5	8	2,86	7,82	5,44	1,48
	Dia 6	5	4,77	6,88	5,61	0,99
	Dia 7	2	5,74	5,75	5,75	0,01
Plaquetas (x10 ³ /μL)	Dia 1	28	19,0	463,0	220,9	113,24
	Dia 2	19	13,9	388,0	160,09	106,36
	Dia 3	19	13,7	478,0	179,21	112,42
	Dia 4	13	14,2	538,0	184,06	141,51
	Dia 5	8	18,0	548,0	169,35	169,08
	Dia 6	5	20,2	258,0	142,5	111,29
	Dia 7	2	19,1	45,2	32,15	18,46
Hemoglobina (g/dL)	Dia 1	28	6,95	21,70	13,89	3,17
	Dia 2	19	7,45	19,50	12,88	3,32
	Dia 3	19	8,07	19,20	12,71	2,77
	Dia 4	13	7,98	16,20	12,88	2,22
	Dia 5	8	6,89	14,30	11,55	2,41
	Dia 6	5	10,7	15,1	12,34	2,17
	Dia 7	2	12,8	13,4	13,1	0,42
Hematócrito (%)	Dia 1	28	24,9	65,70	44,29	9,26
	Dia 2	19	24,8	61,3	41,20	10,24
	Dia 3	19	25,1	62,6	41,18	8,80
	Dia 4	13	25,4	51,1	40,45	6,89
	Dia 5	8	23,1	44,8	37,09	7,28
	Dia 6	5	33,9	46,7	38,94	6,15
	Dia 7	2	39,1	42,5	40,8	2,40

VCM (fl)	<u>Dia 1</u>	28	64,4	78,3	70,98	3,33
	<u>Dia 2</u>	19	65,3	78,4	71,81	3,65
	<u>Dia 3</u>	19	65,1	79,2	71,15	3,57
	<u>Dia 4</u>	13	67,0	78,4	70,98	2,89
	<u>Dia 5</u>	8	56,8	80,7	69,71	6,63
	<u>Dia 6</u>	5	67,9	71,0	69,52	1,38
	<u>Dia 7</u>	2	68,0	74,1	71,05	4,31
HCM (pg)	<u>Dia 1</u>	28	15,3	24,8	22,33	2,04
	<u>Dia 2</u>	19	19,3	24,2	22,4	1,17
	<u>Dia 3</u>	19	19,00	24,1	21,94	1,53
	<u>Dia 4</u>	13	21,2	24,0	22,59	0,79
	<u>Dia 5</u>	8	16,8	24,1	21,66	2,12
	<u>Dia 6</u>	5	21,0	22,7	22,02	0,65
	<u>Dia 7</u>	2	22,3	23,3	22,8	0,71
CHCM (g/dL)	<u>Dia 1</u>	28	22,6	35,6	31,44	2,38
	<u>Dia 2</u>	19	28,8	33,0	31,21	1,23
	<u>Dia 3</u>	19	27,1	33,6	30,90	1,61
	<u>Dia 4</u>	13	30,6	33,8	31,83	0,77
	<u>Dia 5</u>	8	29,6	32,2	31,06	1,01
	<u>Dia 6</u>	5	30,4	32,2	31,68	0,76
	<u>Dia 7</u>	2	31,5	32,8	32,15	0,92

ANEXO II

Tabela 1- Resultados para os neutrófilos não segmentados e os basófilos, incluindo os valores mínimo e máximo, média e desvio padrão diários.

		Nº de casos (n)	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Neutrófilos não segmentados (/µL)	<u>Dia 1</u>	26	0	452	17,38	88,65
	<u>Dia 2</u>	16	0	0	0,00	0,00
	<u>Dia 3</u>	16	0	0	0,00	0,00
	<u>Dia 4</u>	11	0	0	0,00	0,00
	<u>Dia 5</u>	8	0	0	0,00	0,00
	<u>Dia 6</u>	5	0	0	0,00	0,00
	<u>Dia 7</u>	2	0	0	0,00	0,00
Basófilos (/µL)	<u>Dia 1</u>	26	0	0	0,00	0,00
	<u>Dia 2</u>	16	0	0	0,00	0,00
	<u>Dia 3</u>	16	0	0	0,00	0,00
	<u>Dia 4</u>	11	0	0	0,00	0,00
	<u>Dia 5</u>	8	0	0	0,00	0,00
	<u>Dia 6</u>	5	0	0	0,00	0,00
	<u>Dia 7</u>	2	0	0	0,00	0,00

ANEXO III – Casuística Médica e Cirúrgica em Animais de Companhia

Durante os 6 meses de estágio curricular na AZEVET – Clínica Veterinária, foram acompanhados directamente muitos casos clínicos. Não foi possível acompanhar a totalidade da casuística da Clínica, uma vez que, tanto os estagiários como o corpo clínico desempenham funções em sistema rotacional de horários, não estando presentes durante todo o horário de funcionamento da Clínica. Assim sendo, apenas serão ilustrados alguns casos médicos e cirúrgicos em cujos variados actos clínicos existiu uma participação activa e acompanhamento efectivo.

A AZEVET – Clínica Veterinária situa-se em Brejos de Azeitão, Setúbal, sob a direcção clínica da Professora Doutora Maria Manuela Grave Rodeia Espada Niza, tendo como actividade a clínica de animais de companhia.

Nesta Clínica é comum a apresentação de pacientes tanto para primeira consulta como para segunda opinião. É também usual a recepção de animais referenciados de outras clínicas e hospitais veterinários para consultas de especialidade, exames complementares de diagnóstico e cirurgias.

Em seguidas apresentam-se alguns casos acompanhados, bem como vários actos clínicos presenciados e com eles relacionados.

PATOLOGIA MÉDICA

Figura 1 (a, b e c) – Lesões de hiperqueratose da trufa em canídeo Labrador com pênfigus.



Figura 2 (a, b e c) – Biópsia cutânea do mesmo canídeo com *punch*.

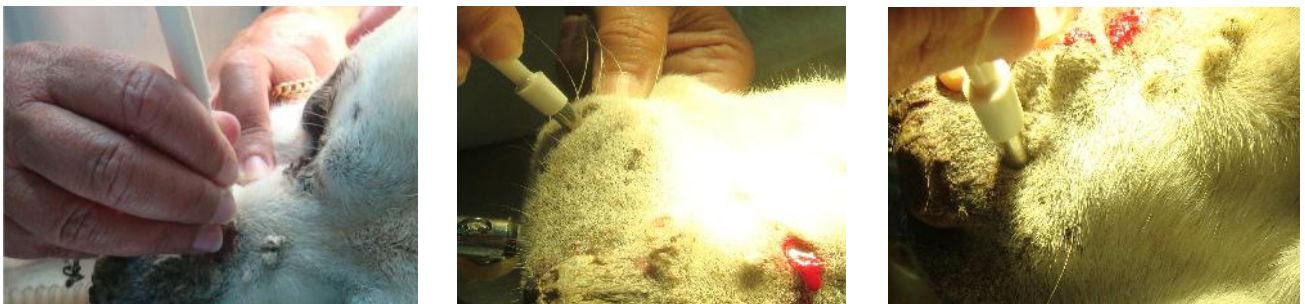


Figura 3 – Canídeo com reacção alérgica, angioedema da face.

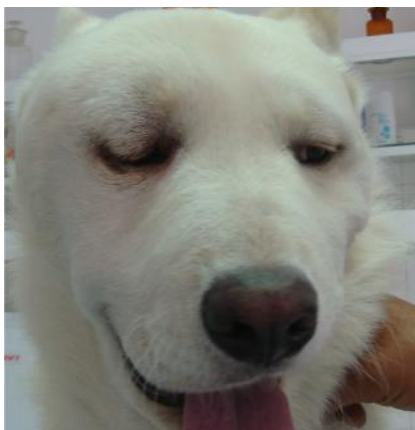


Figura 4 – Raspagem cutânea com *Demodex canis*.



Figura 5 (a e b) – Canídeo Leão da Rodésia com piodermatite no dorso.



Figura 5 – a, b e c) Canídeo com dermatite crónica a *Malassezia spp.*; d) Zaragatoa de pele de *Malassezia spp.* isolada a partir do mesmo animal.



Figura 6 (a e b) – Drenagem e limpeza de abscesso no membro posterior num felídeo.



Figura 7 (a e b) – Canídeo Pastor Alemão com dermatofitose.



Figura 8 – Lacerações traumáticas múltiplas em canídeo, aspecto após tricotomia.



Figura 9 – Sutura de lacerações traumáticas e colocação de dreno, felino.



Figura 10 (a e b) - Lacerações traumáticas múltiplas em felídeo, aspecto após tricotomia.



Figura 11 (a e b) – Alopecia em canídeo por hiperestrogenismo.



Figura 12 – (a e b) Gangrena e edema de membro posterior em canídeo Boxer.



Figura 13 (a, b e c) – Felídeo icterico, aspecto das mucosas oral e ocular.

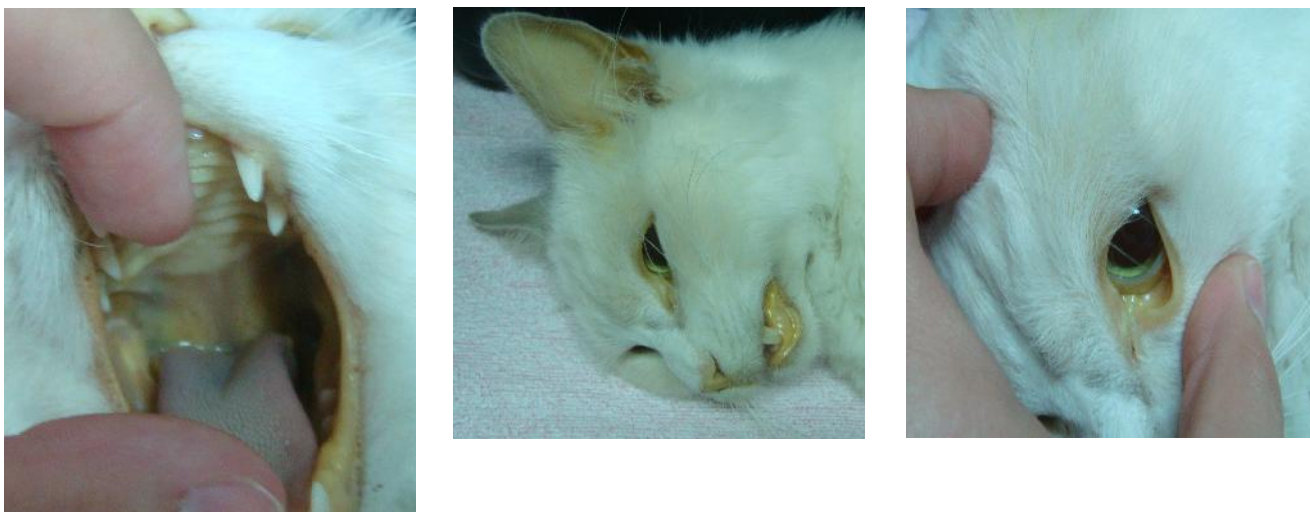


Figura 14 – Fibroadenomatose mamária felina.



Figura 15 – Canídeo com resposta de Schiff – Sherrington.



Figura 16 – a) Canídeo com piómetra aberta; b) Aspecto de corrimento vulvar purulento.



Figura 17 - a) Preparação de felídeo para punção ecoguiada de lobo pulmonar; b) Material necessário à realização da punção.



Figura 18 – Transfusão de sangue total não refrigerado em canídeo.



Figura 19 – Alimentação de felídeo através de tubo nasoesofágico.

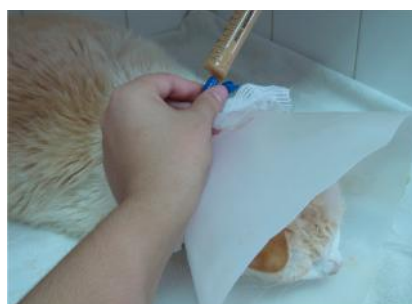


Figura 20 – Canídeo com invaginação intestinal.



Figura 21 – Canídeo com gastroenterite hemorrágica a parvovírus.



Figura 22 – Tumor mamário ulcerado, canídeo.



Figura 23 – Tumor mamário em canídeo Boxer.



Figura 24 – a) Tumor mamário em canídeo Labrador; b) Tumor digital no mesmo canídeo.



Figura 25 – Tumor da cavidade oral em canídeo Caniche.



Figura 26 – Tumor cutâneo em canídeo, aspecto após tricotomia.



Figura 27 – a) Fluidoterapia em leporídeo; b) Realização de ecografia abdominal ao mesmo animal.



Figura 28 – Exame de estado geral a um leporídeo.



PATOLOGIA CIRÚRGICA

Figura 29 (a e b) – Blefaroplastia em canídeo Rottweiler.

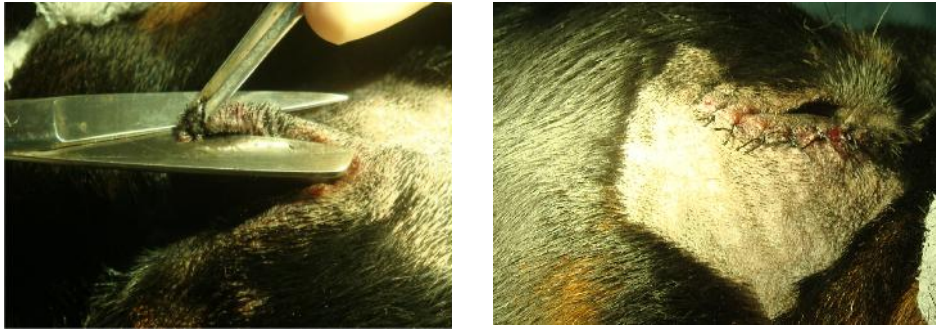


Figura 30 - a) Otohematoma após tricotomia, canídeo;
b) Aspecto final após resolução cirúrgica.



Figura 31 – a) Destartarização em canídeo;
b) Aspecto final após intervenção cirúrgica.

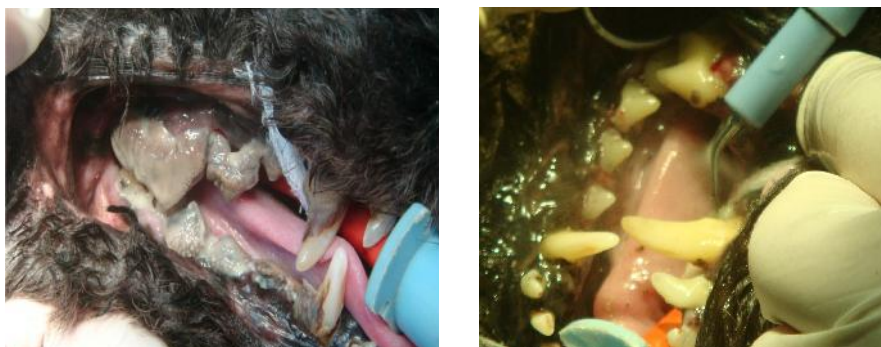


Figura 32 (a e b) – Cirurgia abdominal para resolução de invaginação intestinal, canídeo.

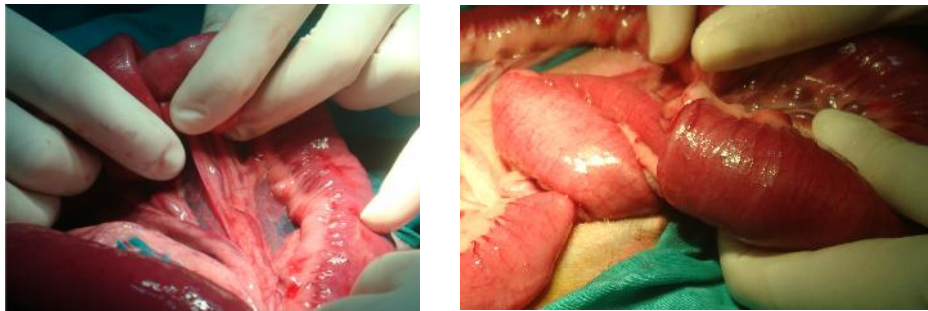


Figura 33 – a) Cistomia em felino; b) Lavagem vesical intra-cirúrgica; c) Conteúdo vesical removido.

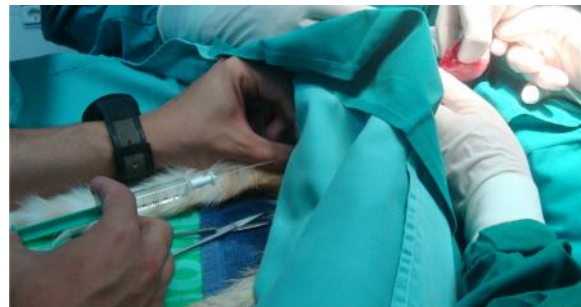


Figura 34 – a) Preparação cirúrgica de felídeo para herniorrafia diafragmática; b e c) Aspecto de sutura.

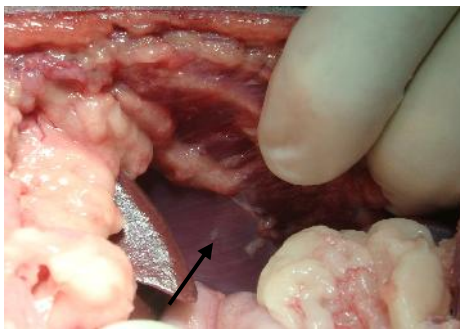
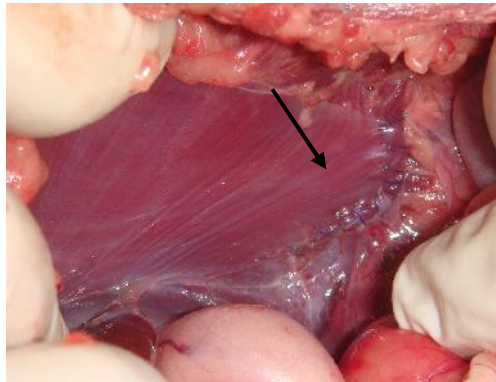


Figura 35 – Aspecto final de resolução de prolapso rectal, felídeo.



Figura 36 (a e b) – Orquiectomia de testículo ectópico com localização inguinal, felídeo.

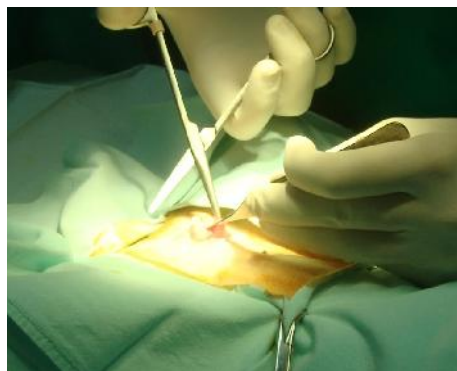


Figura 37 – Mastectomia total unilateral, canídeo.



Figura 38 (a e b) – Orquiectomia em canídeo.

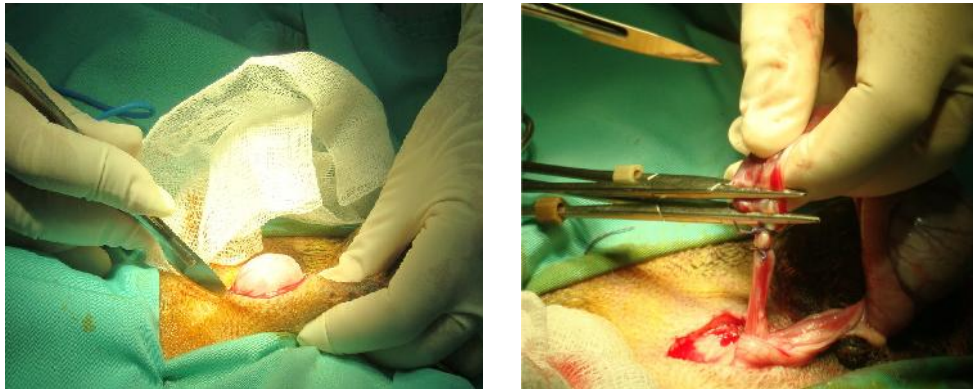


Figura 39 – a) Massa escrotal em canídeo Boxer;
b) Excisão cirúrgica e orquiectomia unilateral.



Figura 40 – a) Ovariohisterectomia com piômetra, em canídeo;
b) Quisto uterino no mesmo animal.



Figura 41 (a e b) – Excisão de pólipos vaginal em canídeo.

